

对虾白斑病毒 (WSSV) 普通 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-801-2

对虾白斑综合征病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 是全球范围内广泛流行并严重威胁虾养殖业的主要病原体，它引起的虾白斑综合征 (Whitespot syndrome, WSS) 是世界动物卫生组织 (International Office of Epizootic Disease, OIE) 规定的必需上报的疫病。WSSV 的宿主广泛，它几乎能感染所有类型的养殖虾和它的甲壳动物，并感染孵化期的虾苗，在 3 d~7 d 使感染的虾病死率达到 90 %~100 %。1993 年中国因 WSSV 感染使对虾养殖减产 70 %，1996 年泰国因 WSSV 感染导致对虾减产 70 000 吨 (占泰国总产量的 40 %)。尽管 WSSV 对全球虾养殖业的危害已逐渐引起人们的关注，但对 WSSV 的防治至今无有效措施，近几年来该病在东亚和东南亚国家和地区的流行仍有报道。WSSV 为双链 DNA (dsDNA) 病毒，由三十多万碱基组成，约含 181 个开放读码框架 (ORF)。PCR 方法是目前检测 WSSV 最常用、最敏感的方法。

为了适应对虾白斑病毒 (WSSV) 快速检测和监测的需要，本公司参照 OIE 水生动物疾病诊断手册 2.2.8 中推荐的引物序列，经多次实验及系统优化，开发生产了本试剂盒。应用本试剂盒进行检测具有快速、灵敏、特异、准确、安全、操作简单、应用广泛等特点及优点。

2、试剂盒组成

试剂盒组成包括核酸提取试剂和核酸扩增试剂，具体组成参见表 1：

表 1：试剂盒组成 (50test/盒)

组成成分	体积
样品 DNA 提取液 1	5ml × 1 管
样品 DNA 提取液 2	500μl × 1 管
核酸扩增试剂： DEPC 水	5ml × 1 管
WSSV PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
WSSV 阳性对照	1ml × 1 管

***保存条件：样品 DNA 提取液 1、2 和试剂盒须在 -20℃ 保存。**

3、样本采集，存放及运输

3.1 样本采集：所用取样器材必须经高压灭菌并烘干。取对虾的鳃丝、肝胰腺、腹肢等组织各 30mg 标记后置于离心管中，按照试剂盒配套的 DNA 抽提试剂操作说明提取 DNA 模板。

3.2 存放：研磨后的样本在 2℃—8℃ 条件下保存应不超过 24 h；-70℃ 以下可长期保存，但应避免反复冻融 (最多冻融 3 次)。

3.3 运输：采用冰壶或泡沫箱加冰密封进行运输。

4、检测步骤

4.1 DNA 核酸提取操作方法 (在样本处理区进行)：

4.1.1 取 n 个 1.5ml 灭菌 Eppendorf 管，其中 n 为待检样品数、一管阳性对照和一管阴性对照之和，

公司地址：北京市顺义区南法信顺畅大道 14 号院东亚首航国际 1 号楼 3 层 3 单元 329 室

公司网址：www.halcyonbio.com

邮 箱：haisentong@126.com

电话：010-50933811, 13718421576, 17718526815

客服 QQ：737481857 835171324

对每个管进行编号标记。

- 4.1.2 每管加入 100 μ l DNA 提取液 1, 然后分别加入待测样本和阴性对照各 100 μ l, 一份样本换用一个吸头; 混匀器上震荡混匀 5 s, 于 4 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 条件下, 12 000 r/min 离心 10 min。
- 4.1.3 尽可能吸弃上清且不碰沉淀, 再加入 10 μ l DNA 提取液 2, 混匀器上震荡混匀 5s, 于 4 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 条件下, 2 000 r/min 离心 10 s。
- 4.1.4 100 $^{\circ}$ C 干浴或沸水浴 10 min; 加入 90 μ l DEPC 水, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 即为提取的 DNA, 冰上保存待用 (提取的 DNA 需在 2 h 内进行 PCR 扩增或放置于-70 $^{\circ}$ C 冰箱内保存)。

注: 本试剂盒提供的阳性对照无需提取核酸, 可直接使用。

4.2 PCR 检测

4.2.1 扩增试剂准备 (在反应混合物配制区进行):

从试剂盒中取出相应的 PCR 反应液、Taq 酶, 2000 \times g 离心 5 秒钟。每个样品测试反应体系配制见下表 2。

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	PCR 反应液	Taq 酶	合计
用量	14.5 μ L	0.5 μ L	15 μ L

4.2.2 加样 (样本处理区进行):

向每个 PCR 管孔中各分装 15 μ L 的混合液, 再分别加入样本 DNA 模板 10 μ L, 盖紧管盖, 500 r/min 离心 30 s。(阳性对照不需要提取核酸, 可以直接吹打混匀后吸取当模板)

4.2.3 PCR 检测 (在检测区进行):

第一阶段, 94 $^{\circ}$ C/4 min;

第二阶段, 94 $^{\circ}$ C/1 min, 55 $^{\circ}$ C/1 min; 72 $^{\circ}$ C/2 min; 40个循环;

第三阶段, 72 $^{\circ}$ C/10 min;

第四阶段, 4 $^{\circ}$ C 保存

4.3 琼脂糖电泳

用电泳缓冲液制备 1.5%的琼脂糖凝胶平板。将平板放入水平电泳槽, 使电泳缓冲液刚好没过胶面, 向 PCR 扩增产物中加入 1/6 体积的电泳上样缓冲液 (6X 上样缓冲液), 按比例混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA DL2000 Marker 做对照。5 V/cm 电泳约 0.5h, 当溴酚蓝到达一定位置时停止。在紫外灯下或凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 电泳带, 拍摄并记录。

5、结果判定

5.1 PCR 后, 阳性对照会出现一条 1447 bp 的 DNA 片段。阴性对照和空白对照没有该核酸带。

5.2 待测样品 PCR 扩增后能在相应 1447 bp DNA 位置上有带, 可判为 WSSV 核酸阳性。

6、相关技术信息

F: 5' -ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCTAG-3'

R: 5' -TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A-3'