

对虾白斑综合征病毒 (WSSV) 荧光 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-801-1

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别的甲壳动物, 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 2.2.6中推荐的引物和探针序列, 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 荧光 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
WSSV 荧光阳性对照	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。

受精卵、3cm以下幼虾、仔虾、幼体采集整条对虾作为样品, 成虾采集上皮、肝胰腺、肠或腮作为样品。用搅拌器将样品匀浆成糊状取30mg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 °C-8 °C条件下保存应不超过24 h; -70 °C以下可长期保存, 但应避免反复冻融 (最多冻融3次)。

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 329 室
公司网址: www.halcyonbio.com 电话: 010-50933955, 13718421576, 18610566381
邮 箱: haisentong@126.com 客服 QQ: 737481857 1632557907
淘宝店铺: https://shop484557060.taobao.com/ 微 信: Halcyonbio



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 为待检样品数和一管阴性对照之和，对每个管进行编号标记。(注：试剂盒中的阳性对照直接作为 PCR 检测的模板，无需提取核酸)
- 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）。

4.2 荧光 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荧光 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	荧光 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）：

向每个荧光 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。

4.2.3 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：

第一阶段，95 $^{\circ}$ C/4 min；

第二阶段，95 $^{\circ}$ C/15 sec，60 $^{\circ}$ C/40 sec，40 个循环，在第二阶段每次循环的退火延伸时收集荧光。试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

5、结果判定

5.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

5.2 质控标准

5.2.1 阴性对照无 Ct 值或无扩增曲线。

5.2.2 阳性对照的 Ct 值应<28.0，并出现典型的扩增曲线。否则，此次实验视为无效。

5.3 结果描述及判定

5.3.1 阴性

无Ct值或无扩增曲线，示样品中无WSSV核酸。

5.3.2 阳性





Ct值 \leq 30, 且出现典型的扩增曲线, 示样品中存在WSSV核酸。

5.3.3 有效原则

Ct $>$ 30 的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性, 否则为阳性。

6、相关技术信息

F: 5'-TGG-TCC-CGT-CCT-CAT-CTC-AG-3',

R: 5'-GCT-GCC-TTG-CCG-GAA-ATT-A-3',

Probe: 5'FAM-AGC-CAT-GAA-GAA-TGC-CGT-CTA-TCA-CAC-A-TAMRA3'.

