



中华人民共和国国家标准

GB/T 25878—2010

GB/T 25878—2010

对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHHNV)检测 PCR法

Polymerase chain reaction (PCR) method for infectious hypodermal and
haematopoietic necrosis virus (IHHNV)

中华人民共和国
国家标准
对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒
(IHHNV)检测 PCR法
GB/T 25878—2010

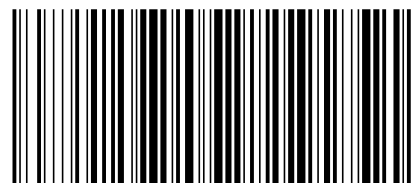
*
中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn
电话:68523946 68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 10 千字
2011年2月第一版 2011年2月第一次印刷

*
书号: 155066·1-41601 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



GB/T 25878-2010

2011-01-10 发布

2011-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

表 B.1 (续)

试验结果	结果判读及原因分析	问题排除
凝胶上无任何影像,包括 DNA 分子质量标准	3. 凝胶太厚	重新制作琼脂糖凝胶片
	4. 电极颠倒或电泳时间过长	改正电极方向,重新加样电泳
	5. 溴化乙锭(EB)分解失效	重新配制溴化乙锭(EB)
^a 溴化乙锭(EB)有毒,试剂的操作和废弃物的处理按 SC/T 7202.2—2007 中附录 B 的规定执行。		

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国水产科学研究院黄海水产研究所、农业部全国水产技术推广总站。

本标准主要起草人:黄健、杨冰、朱泽闻、宋晓玲、孙喜模、赵红萍、刘莉。

附录 A
(资料性附录)

对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)聚合酶链式反应(PCR)检测产物序列

1	GAGGAGAGAG	CTGTAGTAGC	GGAACACAAC	CCGACTTTAT	TGAAGGGACT	CCCAACGGAC
			F			
61	CGGACGAAAT	GGACGGAAGG	CGACTGGAAG	AGAGTGAGAT	TGATAAACAA	GTGGAAAGTA
121	CAACATGGTA	CACCTTCGTC	ATCAGAGAAA	AACCACAACC	AAGAAGACTC	TCCGGACGAA
181	CGCCAAACTT	CACCATTACA	GATCATGGTG	ACCACTGGCA	CATCACATAC	TCCGGACACC
241	CAACCAATAA	GACCAGACAT	AGAGCTACAA	TCCTCGCCTA	TTTGGGAGTT	ACCTTTGCTG
301	CCAGAGCCGA	AGCTGAAGCG	ACTACGGTAC	TTGTTAGAAA	TATCAAGAGA	TGGATACTCT
361	ATCTTATCAG	ATACGGTATT	GAACGGCTTT	CGTATTTTGG	TCTTGCCAC	GCCATTTTTA
			R			

图 A.1 对虾 IHHNV PCR 检测产物序列

对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHHNV)检测 PCR 法

警告:使用本标准的人员应有正规实验室工作的实践经验,本标准并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施,并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本标准规定了对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)聚合酶链式反应(PCR)检测方法的原理、所需试剂和材料、仪器和设备、操作步骤和结果判定。

本标准适用于对虾、环境生物、饵料生物和其他各种非生物样品中传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的定性检测。不适用于对病毒量或感染活性的估测以及宿主感染程度的评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

SC/T 7202.1—2007 斑节对虾杆状病毒诊断规程 第1部分:压片显微镜检查法

SC/T 7202.2—2007 斑节对虾杆状病毒诊断规程 第2部分:PCR 检测法

3 原理

3.1 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒及其流行特征

传染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, IHHNV)粒子大小为 20 nm~22 nm,是无囊膜二十面体,在氯化铯中的浮力密度为 1.40 g/mL,含线状单链 DNA,长度为 4.1 kb,衣壳由 4 个分子质量分别为 74 kD、47 kD、39 kD、37.5 kD 的多肽组成。

IHHNV 可感染世界各地的养殖对虾,其感染细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)会引起急性传染病和高死亡率(90%),稚虾受到的危害最严重。IHHNV 感染凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)会引起慢性“矮小残缺综合症”(RDS),主要影响是患病对虾生长缓慢,畸形,受感染存活对虾终生带毒,通过垂直和水平传播。

3.2 技术原理

IHHNV 的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)是以 IHHNV 的一段 389 个碱基(b)长度的特异性 DNA 序列作为模板,以与模板两端序列互补的一对特异性寡核苷酸序列作为引物,在四种脱氧核糖核苷三磷酸存在下,利用依赖 DNA 的 DNA 聚合酶的合成作用,经过数十次变性、退火和延伸的反应循环,使模板上介于两个引物之间的 DNA 片段得到特异性地指数扩增,再通过电泳等手段检测到被特异性扩增的片段,从而揭示微量 IHHNV DNA 的存在。

4 试剂和材料

4.1 所需试剂除引物、阳性对照和阴性对照以外,按照 SC/T 7202.2—2007 中第 5 章的规定。

4.2 100 ng/ μ L 引物 F:5'-CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3',-20 °C 保存。

4.3 100 ng/ μ L 引物 R:5'-GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3',-20 °C 保存。

4.4 阳性对照为已知 IHHNV 阳性的组织样品的 DNA 模板,-20 °C 保存。