

ICS 65.020.30  
B 41



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 15805.4—2008  
部分代替 GB/T 15805.1—1995

GB/T 15805.4—2008

## 鱼类检疫方法

### 第4部分:斑点叉尾鲷病毒(CCV)

Quarantine methods of fish—  
Part 4: Channel catfish virus(CCV)

中华人民共和国  
国家标准  
鱼类检疫方法  
第4部分:斑点叉尾鲷病毒(CCV)

GB/T 15805.4—2008

\*

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 13 千字

2008年10月第一版 2008年10月第一次印刷

\*

书号:155066·1-34023 定价 14.00 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 15805.4—2008

2008-07-31 发布

2008-11-01 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

附录 B  
(资料性附录)

CCV 的 PCR 产物序列

TCA-TCC-GAA-TCC-GAC-AAC-TGA-CGC-GTC-GGT-AGC-CCG-ACC-GAT-CCG-TAT-GTT-  
ACG-GGT-GCG-GGG-GTC-GAC-ACC-GTG-CTC-GCC-GCG-ATG-AGG-CTG-ACC-GCG-GAC-  
ACG-GGG-GGT-CCC-CCT-CGT-TTC-TCC-GCG-ATC-TTG-G

注：涂墨和下划线处是引物序列。

## 前 言

GB/T 15805《鱼类检疫方法》分为下列部分：

- 第 1 部分：传染性胰脏坏死病毒(IPNV)；
- 第 2 部分：传染性造血器官坏死病毒(IHNV)；
- 第 3 部分：病毒性出血性败血症病毒(VHSV)；
- 第 4 部分：斑点叉尾鲷病毒(CCV)；
- 第 5 部分：鲤春病毒血症病毒(SVCV)；
- 第 6 部分：杀鲑气单胞菌；
- 第 7 部分：脑粘体虫；

……

本部分为 GB/T 15805 的第 4 部分。

本部分代替 GB/T 15805.1—1995《淡水鱼类检疫方法 第一部分》中的第 6 章。

本部分与 GB/T 15805.1—1995 的第 6 章相比主要变化如下：

- 增加了用 PCR 方法鉴定 CCV；
- 增加了资料性附录“CCV 的 PCR 产物序列”；
- 结构格式按 GB/T 1.1—2000 的规定，作为部分编写。

本部分的附录 A 为规范性附录，附录 B 为资料性附录。

本部分由中华人民共和国农业部提出。

本部分由全国水产标准化技术委员会归口。

本部分起草单位：农业部全国水产技术推广总站、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：孙喜模、江育林、陈爱平、陈辉、朱泽闻。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 15805.1—1995。

### 7.3 PCR

依次加入以下试剂:模板 10  $\mu\text{L}$ ,10 倍用浓缩的 Taq 酶缓冲液 10  $\mu\text{L}$ (见第 A.5 章),25 mmol/L 的氯化镁( $\text{MgCl}_2$ )(见第 A.6 章)10  $\mu\text{L}$ ,Taq 酶 5U,dNTP 2  $\mu\text{L}$ ,引物各 2.5  $\mu\text{L}$ ,加水到总体积为 100  $\mu\text{L}$ 。

每管加入 50  $\mu\text{L}$  矿物油。短时间低速离心让矿物油集中在上层。再将反应管置于 PCR 扩增仪。先 94  $^{\circ}\text{C}$  4 min 预变性,再 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min $\rightarrow$ 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min $\rightarrow$ 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,30 次循环,然后 72  $^{\circ}\text{C}$  8 min,最后 4  $^{\circ}\text{C}$  保温。

### 7.4 对照的设立

7.4.1 在 7.1 的样品处理过程中应设立阳性对照、阴性对照和空白对照。

7.4.2 取含有已知 CCV 病毒标准株的细胞悬液作为阳性对照。

7.4.3 取正常的细胞悬液作为阴性对照。

7.4.4 取等体积的水代替模板作为空白对照。

### 7.5 琼脂糖电泳

用 TBE 电泳缓冲液(见第 A.7 章)配制 2% 的琼脂糖(含 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EB,见第 A.8 章)平板。将平板放入水平电泳槽,使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将 6  $\mu\text{L}$  样品和 2  $\mu\text{L}$  样品缓冲液(见第 A.9 章)混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA 标准分子质量作对照,推荐使用 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II)。5 V/cm 电泳约 0.5 h,当溴酚蓝到达底部时停止。在紫外灯下观察核酸带并判断结果。

### 7.6 结果判定

含有 CCV 的阳性对照在 PCR 以后应出现 136 bp 的 DNA 带。而阴性对照和空白对照不应有这个 DNA 带。如果待测样品中看不到 136 bp 的带为阴性,能看到 136 bp 的带为阳性。

如果阳性对照中什么带都看不到,说明 PCR 反应没有发生。如果阴性样品中有 136 bp 的带,说明试验中有污染需要重做。如果待测样品产生的 DNA 带大小异常或者无法准确判定大小,需要重新做并将片段进行基因测序,然后与已知标准基因序列比较(参见附录 B)。

## 8 综合判定

8.1 若出现临床症状,经细胞培养又出现 CPE,并经中和试验或者 PCR 试验为阳性者可判定患有斑点叉尾鲷病毒病。

8.2 经细胞培养出现 CPE,并经中和试验或者 ELISA 检测为阳性者,若出现临床症状,可判定患有斑点叉尾鲷病毒病;若无临床症状,判定为 CCV 携带者。

8.3 若分离到病毒后,仅中和试验为可疑,PCR 试验为阴性,则判定为可疑。

## 鱼类检疫方法

### 第 4 部分:斑点叉尾鲷病毒(CCV)

#### 1 范围

GB/T 15805 的本部分规定了用中和试验和 PCR 技术检测斑点叉尾鲷病毒(CCV)的方法。

本部分适用于 CCV 的分离与鉴定,斑点叉尾鲷病毒病的流行病学调查、诊断、监测以及口岸出入境、国内跨区域移动的检疫。

#### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 15805 的本部分的引用而成为本部分的条款。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部分,然而,鼓励根据本部分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部分。

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法(neq ISO 3696:1987)

GB/T 18088—2000 出入境动物检疫采样

#### 3 试剂和材料

3.1 水:GB/T 6682—1992,一级。

3.2 CCV 毒株和 CCV 的 DNA:由农业部指定的动物病原微生物菌(毒)种保藏机构提供。

3.3 阴性对照:正常细胞组织悬液。

3.4 CCV 参考抗血清。

3.5 Taq 酶:—20  $^{\circ}\text{C}$  保存,不要反复冻融或温度剧烈变化。

3.6 dNTP(含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10 mmol/L)。

3.7 引物:使用时浓度为 40  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。其序列如下:

上游引物:5'-TCA-TCC-GAA-TCC-GAC-AAC-TGA-3';

下游引物:5'-CCA-AGA-TCG-CGG-AGA-AAC-3'。

扩增目的基因中的 136 bp 片段。

3.8 无水乙醇:分析纯,使用前预冷到—20  $^{\circ}\text{C}$ 。

3.9 矿物油:要求无 DNA 酶和 RNA 酶。

3.10 DNA 分子质量标准(Marker)。

#### 4 器材和设备

4.1 96 孔细胞培养板。

4.2 微量移液器及吸头。

4.3 倒置显微镜。

4.4 恒温培养箱。

4.5 普通冰箱和低温冰箱。

4.6 组织研磨器。

4.7 离心机和离心管。