



中华人民共和国国家标准

GB/T 28630.2—2012

GB/T 28630.2—2012

白斑综合征(WSD)诊断规程 第2部分:套式PCR检测法

Diagnostic protocols for white spot disease—
Part 2: Nested PCR method

中华人民共和国
国家标准
白斑综合征(WSD)诊断规程
第2部分:套式PCR检测法
GB/T 28630.2—2012

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
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 1.25 字数 29 千字
2012年11月第一版 2012年11月第一次印刷

*

书号: 155066·1-45621 定价 21.00 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)68510107



GB/T 28630.2—2012

2012-07-31 发布

2012-11-01 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 C
(资料性附录)

白斑综合征(WSD)套式 PCR 检测产物序列

1 GTCGACAGAC TACTAACTTC AGCCTATCTA GTAAAACAAG CTAAAAGATT CGACGGAGTT
 61 GACCCAGCCT TCCCTGCCGC CCTCACCTGC GCTTCTCACC TCATGCTTTC TTCCATGGAT
 121 TCCCATACAA AGTCATCTTT CATGGACAAC ATCAAATTGC ACATGACTGA TACTCAATGC
 181 TTCTTCAAGA ACATTGAACG ATTTGAGAAA TTCTTGGGAA GATATGGGGA CGAATACGCC
 241 ATGTCCCACA AGCAAAATTG TAAGTGGCCC TTCCATCTCC ACCACACTTT TACTCCCTCA
 301 GATAACGAGC ATCTGGTATC CTCTTTCGCA TTCGCCCCGCC CAGAAGTCTC CATGGAAGAA
 361 ATTAGAGCCA CACCCTATCA GGCCAACAAG CTTATTAGTG ACAAACATTA CGTGATGAAC
 421 ATGTCCAAGA TCGATTCTAG AGTAACAGGA TCTTCCCTCC TTAAGAAGGT TAGCGAATGG
 481 ACTGAAATGA GAATGAACTC CAACTTTAAT GGAACATTTG AACCATCAAG ACTCGCCCTC
 541 TCCAACCTCTG GCATGACAAC GGCAGGAGTC AACCTCGACG TTATTGTCAA ACCAAATAAT
 601 GCAAGAAGTG TACTAGGAAT ATTGGAATGT CATCGCCAGC ACGTGTGCAC CGCCGACGCC
 661 AAGGGAAGTG TCGCTTCAGC CATGCCAGCC GTCTTCCAGG CAACCGATGG AAACGGTAAC
 721 GAATCTGAAC TGATCCAGAA TGCTCTGCCA AGGAACAGAT ACATCCAAAA GAGCACAATG
 781 AACGCTCAAA CTGTGCTGTT TGCTAATGTT TTGGAACAAC TTATCGCCGA TCTTGAAAG
 841 GTTATCGTGA ACGAACTGGC CGGCACCATC GCTGAATCTG TACCAGAAAG CGTATATGAA
 901 AACACCAAGG AAATGATTGA TAGACTAGGC TCTGACGACC TCTTCAAATC TAATAATAAT
 961 GGAGGAGTAG AATCAATGGA TTATGAAGAT AGCGAAACAA CATCCAACAA TGGTCCCGTC
 1021 CTCATCTCAG AAGCCATGAA GAATGCCGTC TATCACACAC TAATTTCCGG CAAGGCAGCT
 1081 CGCCCGGAAA ATGTACCATT CGCCTCATGC GCCAGCGGCC CTCTCGCCTT TGATTTCCCTT
 1141 CTGTCAAAGG GAGATACATT CGAAGAAAAG AACGCCGAA AAGGTGCAGC AGCTGCCGTA
 1201 TCCTCTACCT ATTCTTCCTC TTCTAACACT ACTCTTCGTA AGCATTGGC TCGAGTTTTTC
 1261 GAAGCCATCT CTAAGCAAGT AACTGATGCT GAATTC AAGG ATATCCTCAA CGATATCGAA
 1321 CGTAATATTT CTTCTGACTA TACTAACTGT CCACCAAATA CTAACCAAAA TGCCTTTGCT
 1381 CTAGCTATCA AGAGAGAATT CAGCAGAATT GTTTCCTTCT TAACCATTCT TCGTAAGAAC
 1441 ATTACACCCG CATTAGTCGA C
 R1

前 言

GB/T 28630《白斑综合征(WSD)诊断规程》分为五个部分:

- 第 1 部分:核酸探针斑点杂交检测法;
- 第 2 部分:套式 PCR 检测法;
- 第 3 部分:原位杂交检测法;
- 第 4 部分:组织病理学诊断法;
- 第 5 部分:新鲜组织的 T-E 染色法。

本部分为 GB/T 28630 的第 2 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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(SAC/TC 156)归口。

本部分起草单位: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。

本部分主要起草人:黄健、杨冰、陈爱平、宋晓玲、史成银、杨丛海、魏琦、刘莉。

附录 B (规范性附录)

PCR 实验室要求和化学药品及仪器设备操作安全注意事项

B.1 PCR 实验室分区

PCR 前和 PCR 及 PCR 后的工作范围应分区成为相互隔离的实验室,所需试剂、仪器、实验室各种用品、工作服等均应独立使用。长期从事常规性 PCR 检测工作的人员也应进行专门分工。

专用于进行套式 PCR 检测的实验室应分为四个隔离的区域(房间),包括洁净区、样品区、扩增区、电泳区。洁净区和样品区属于 PCR 前区,扩增区和电泳区属于 PCR 后区。其中洁净区专用于配制和分装 PCR 所用试剂,不应接触任何样品;样品区专用于进行样品的处理和第一步 PCR 的加样,不应接触任何 PCR 产物;扩增区专用于进行 PCR 循环和第二步 PCR 的加样,不应暴露第二步 PCR 产物,由于暴露第一步 PCR 产物也可能造成严重污染,应对扩增区经常进行产物污染的消除处理;电泳区专用于 PCR 产物的检测。只允许从洁净区→样品区→扩增区→电泳区的单向物流,同时 PCR 后区应尽可能避免各步 PCR 产物的污染。

应定期对专门从事 PCR 的实验室各区的产物污染程度进行测试评估,并有针对性地进行消除产物污染的处理。

B.2 含 PCR 反应产物的材料

PCR 反应产物的不当处理会造成实验室的严重污染,含 PCR 反应产物的用品,如枪头、离心管、凝胶和手套等应用 3.0×10^{-3} 浓度的含氯消毒剂溶液处理后,再以塑料袋密封包装后丢弃,含有 PCR 反应产物的溶液应加入含氯消毒剂达 3.0×10^{-3} 的浓度,经处理 10 min 以上后方可直接倒入下水道口。可能沾污 PCR 反应产物的衣物、桌椅、拖把、扫帚、垃圾桶等严禁带入 PCR 前区。应保存的 PCR 产物只能密封保存在 PCR 后区。

B.3 溴化乙锭

溴化乙锭为致癌物,有中度毒性,可通过皮肤或粘膜吸收,对环境有污染,应按照以下方法来进行操作或处理。

B.3.1 溴化乙锭浓溶液的净化处理

加入足量的水使溴化乙锭的浓度降低至 0.5 mg/mL 以下。加入 1 倍体积的 0.5 mol/L 高锰酸钾,小心混匀后再加 1 倍体积的 2.5 mol/L 盐酸。小心混匀,于室温放置数小时。加入 1 倍体积的 2.5 mol/L 氢氧化钠,小心混匀后可丢弃该溶液。

0.5 mol/L 高锰酸钾、2.5 mol/L 盐酸、2.5 mol/L 氢氧化钠按附录 A 的规定配制。

B.3.2 溴化乙锭稀溶液的净化处理

每 100 mL 溶液中加入 100 mg 粉状活性炭。于室温放置 1 h,不时摇动。用 Whatman1 号滤纸过滤溶液,丢弃滤液。用塑料袋封装滤纸和活性炭,作为有害废物处理。

白斑综合征(WSD)诊断规程 第 2 部分:套式 PCR 检测法

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

GB/T 28630 的本部分规定了白斑综合征病原的套式 PCR 检测方法所需试剂与材料、仪器设备、操作步骤和结果判定。

本部分适用于在对虾的各种样品、环境生物和饵料生物的各种样品,以及其他各种非生物样品中对白斑综合征病原带毒情况的高灵敏度定性检测,以进行病原筛查和疾病的确诊。

本部分单独使用时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

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有修改单)适用于本文件。

GB/T 28630.4—2012 白斑综合征(WSD)诊断规程 第 4 部分:组织病理学诊断法

3 原理

3.1 白斑综合征的病原和病理学特征

见 GB/T 28630.4—2012 的 2.1。

3.2 技术原理

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)是以待测样品的一段 DNA 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,从而可揭示微量病毒 DNA 的存在。套式 PCR 是在第一步 PCR 扩增的产物内,再用一对引物进行第二步 PCR 扩增。套式 PCR 可大大增加 PCR 检测的灵敏度和反应特异性。

4 试剂和材料

- 4.1 除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的化学试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。
- 4.2 无水乙醇。
- 4.3 液体石蜡。
- 4.4 含氯消毒剂:医用品或水产药物。
- 4.5 琼脂糖:电泳级。