

虾白尾病（WTD）RT-PCR 检测试剂盒（MrNV）说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-810-3

虾白尾病（White tail disease, WTD）也称为白肌肉病（White muscle disease, WMD）或罗氏沼虾肌肉白浊病（*Macrobrachium rosenbergii* Whitish muscle disease），主要在亚洲和南美洲北部流行。其主要病原为罗氏沼虾野田村病毒（*Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus, MrNV），研究发现感染对虾中还存在另外一种超小型病毒（Extra small virus, XSV），为 MrNV 的微型病毒。虾感染后腹部、尾部出现白色浑浊，最终可扩散全身肌肉，死亡率可达 95% 以上。为了适应虾白尾病快速检测和疫病研究的需要，本公司依据最新 OIE 中 2.2.6 和《白尾病检疫技术规范》（SN/T 3583-2013）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、操作简单、应用广泛和高通量检测等特点及优点。

2、试剂盒组成

试剂盒组成包括核酸扩增试剂。具体组成参见表 1：

表 1：试剂盒组成（50test/盒）

试剂盒组成成分	体积
核酸提取试剂：核酸裂解液	15ml × 2 管
核酸扩增试剂：DEPC 水	1ml × 1 管
WTD-MrNV RT-PCR 反应液	750μL × 1 管
酶混合物	60μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
WTD-MrNV 阳性对照	1ml × 1 管

（注：核酸提取试剂可使用本公司生产的提取核酸更快捷方便的《病毒 RNA 柱式提取试剂盒》）

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。随机取 5 只-10 只新鲜的虾作为采样标本，采集的部位包括：虾头部的鳃丝、肝胰腺、淋巴器官或血淋巴等组织（可部分或全部采集这些组织）。对于仔虾或稚虾，取整只虾或虾头作为样品；虾粪便直接匀浆待检。详见相关标准。

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、RT-PCR 检测

4.1 RNA 核酸提取操作方法

4.1.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，其中 n 为被检样品与阴性对照的和（阳性对照、阴性对照已标出），做标记。（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 600 μL 裂解液，分别加入被检样本和阴性对照各 200 μL，一份样本换用一个吸头，再加入 200 μL 氯仿，混匀器上振荡混匀 5 s（不能过于强烈，以免产生乳化层，也可以用手颠倒混匀），于 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min。

4.1.3 取与 4.1.1.1 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，加入 500 μ L 异丙醇（-20℃预冷），做标记。吸取 4.1.1.2 各管中的上清液转移至相应的管中，上清液应至少吸取 500 μ L，不能吸出中间层，颠倒混匀。

4.1.4 于 4℃、12 000 r/min 离心 15 min（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清，倒置于吸水纸上，沾干液体（不同样品须在吸水纸不同地方沾干）；加入 600 μ L 75%乙醇，颠倒洗涤。

4.1.5 于 4℃、12 000 r/min 离心 10 min（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清，倒置于吸水纸上，尽量沾干液体（不同样品须在吸水纸不同地方沾干）。

4.1.6 4 000 r/min 离心 10s（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），将管壁上的残余液体甩到管底部，小心倒去上清，用微量加样器将其吸干，一份样本换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面，室温干燥 3 min，不能过于干燥，以免 RNA 不溶。

4.1.7 加入 11 μ L DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2 000 r/min 离心 5 s，冰上保存备用。提取的 RNA 须在 2 h 内进行 PCR 扩增；若需长期保存须放置 -70℃冰箱内。

【也可参照《病毒 RNA 柱式提取试剂盒说明书》（货号：HB-QPCR-01）使用，更方便快捷提取核酸】。注：提取的 RNA 须在 2 h 内进行 PCR 扩增；若需长期保存须放置 -70℃冰箱内。

4.2 RT-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 RT-PCR 反应液、酶混合物，在室温下融化后，2000 r/min 离心 5 s。每个样品测试反应体系配制见表 2：

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	RT-PCR 反应液	酶混合物
用量	15 μ L	1.0 μ L

4.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个 PCR 管空中各分装 15 μ L 的混合液，再分别加入上述样本处理步骤 4.1.7 中制备的 RNA 溶液各 10 μ L，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。（注：试剂盒中的阳性对照可直接作为 PCR 检测的模板，使用前混匀）

4.2.3 RT-PCR 检测（在检测区进行）：

第一阶段：42℃ /30 min；

第二阶段：95℃ /2 min；

第三阶段：94℃ /40 sec, 55℃ /40 sec, 68℃ /1 min, 30 个循环；

第四阶段：72℃ /10 min；

第五阶段：4℃ 保存

4.3 琼脂糖电泳

用电泳缓冲液制备 1.0% 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 RT-PCR 后，阳性对照会出现一条 425 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 425 bp DNA 位置上有带，可判为 MrNV 核酸阳性。