

## 虾白尾病（WTD）荧光 RT-PCR 检测试剂盒（XSV）说明书

### 1、试剂盒简介

货号：HB-810-2

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，本公司参考 2016 年 OIE 水生动物疾病诊断手册 2.2.7 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、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-XSV 荧光 RT-PCR 反应液	750 μL × 1 管
酶混合物	60 μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
WTD-XSV 荧光阳性对照	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：虾头部的眼柄、肝胰腺、头腹部肌肉或腹肢等（可部分或全部采集这些组织）。详见相关标准。

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）。

3.3 运输：采用冰壶或泡沫箱加冰密封进行运输。

### 4、荧光 RT-PCR 检测

#### 4.1 操作方法

4.1.1 样本的处理（在样本制备区进行）：

4.1.1.1 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



对照在试剂盒中已标出), 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)

- 4.1.1.2 每管加入 600  $\mu\text{L}$  裂解液, 分别加入被检样本和阴性对照各 200  $\mu\text{L}$ , 一份样本换用一个吸头, 再加入 200  $\mu\text{L}$  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 $^{\circ}\text{C}$  12 000 r/min 离心 15 min。
- 4.1.1.3 取与 4.1.1.1 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管, 加入 500  $\mu\text{L}$  异丙醇 (-20 $^{\circ}\text{C}$  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 $\mu\text{L}$ , 不能吸出中间层, 颠倒混匀。
- 4.1.1.4 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、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  $\mu\text{L}$  75% 乙醇, 颠倒洗涤。
- 4.1.1.5 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、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)。
- 4.1.1.6 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。
- 4.1.1.7 加入 11  $\mu\text{L}$  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 $^{\circ}\text{C}$  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 $^{\circ}\text{C}$  冰箱内。

#### 4.1.2 检测

##### 4.1.2.1 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 RT-PCR 反应液、酶混合物, 在室温下融化后, 2000 r/min 离心 5 s。设所需荧光 RT-PCR 检测总数为 n, 其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和, 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 $\mu\text{L}$	1.0 $\mu\text{L}$

根据测试样品的数量计算好各试剂的使用量, 加入到适当体积试管中, 充分混合均匀, 向每个荧光 RT-PCR 管中各分装 16  $\mu\text{L}$ , 转移至样本处理区。

##### 4.1.2.2 加样 (样本处理区进行):

在各设定的荧光 RT-PCR 管中分别加入上述样本处理步骤 4.1.1.7 中制备的 RNA 溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 盖紧管盖, 500 r/min 离心 30 s。

##### 4.1.2.3 荧光 RT-PCR 检测 (在检测区进行):

将 4.1.2.2 中离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内, 记录样本摆放顺序。

循环条件设置:

第一阶段: 42 $^{\circ}\text{C}$  /60 min;

第二阶段: 95 $^{\circ}\text{C}$  /10 min;

第三阶段: 95 $^{\circ}\text{C}$  /15 sec, 58 $^{\circ}\text{C}$  /30 sec, 40 个循环, 在 58 $^{\circ}\text{C}$  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。

注: 本试剂盒采用 Eva Green 荧光染料标记, 荧光波长与 SYBR Green 相近, 进行检测时选取 SYBR Green 染料法即可!



## 4.2 结果判定

### 4.2.1 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。

### 4.2.2 质控标准

#### 4.2.2.1 阴性对照无 Ct 值或无扩增曲线。

#### 4.2.2.2 阳性对照的 Ct 值应 $<25.0$ ，并出现典型的扩增曲线。否则，此次实验视为无效。

### 4.2.3 结果描述及判定

#### 4.2.3.1 阴性

无 Ct 值或无扩增曲线，示样品中无待检病原核酸。

#### 4.2.3.2 阳性

Ct 值 $\leq 30$ ，且出现典型的扩增曲线，示样品中存在待检病原核酸。

#### 4.2.3.3 有效原则

Ct 值 $>30$ 的样本建议重做。重做结果无数值者或仍大于 30 为阴性，否则为阳性。

