



中华人民共和国水产行业标准

SC/T 7244—2025

虾类传染性早熟病毒感染诊断方法

Diagnostic methods for infection with infectious precocity virus of prawn

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部

发布



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部渔业渔政管理局提出。

本文件由全国水产标准化技术委员会水产养殖病害防治分技术委员会(SAC/TC 156/SC 11)归口。

本文件起草单位：中国水产科学研究院黄海水产研究所、浙江省淡水水产研究所、湖州师范学院。

本文件主要起草人：董宣、潘晓艺、王国浩、黄捷、张庆利、邱亮、黄笑、蔺凌云、沈锦玉、杨国梁。



虾类传染性早熟病毒感染诊断方法

1 范围

本文件描述了虾类传染性早熟病毒感染诊断的试剂和材料、仪器设备、临床症状、样品,以及组织病理学检测、原位杂交检测、套式 RT-PCR 检测、RT-qPCR 检测、RT-LAMP 检测和综合判定的方法。

本文件适用于虾类传染性早熟病毒感染的流行病学调查、诊断、检疫和监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)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

GB/T 40257—2021 桃拉综合征诊断规程 RT-PCR 检测法

SC/T 7011.1 水生动物疾病术语与命名规则 第1部分:水生动物疾病术语

SC/T 7011.2 水生动物疾病术语与命名规则 第2部分:水生动物疾病命名规则

3 术语和定义

SC/T 7011.1 和 SC/T 7011.2 界定的术语和定义适用于本文件。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AMV:禽类成髓细胞瘤病毒(avian myeloblastosis virus)

AP:碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)

BCIP:5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸-甲苯胺盐(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt)

bp:碱基对(base pair)

C_t 值:阈值循环数,即荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数(cycle-threshold value)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate)

DIG:地高辛(digoxigenin)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTPs:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid)

IPV:传染性早熟病毒(infectious precocity virus)

M-MLV:莫洛尼鼠白血病病毒(moloney-murine leukemia virus)

NBT:氯化硝基四氮唑蓝(4-nitro blue tetrazolium chloride)

PBS:磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline)

PBST:含 Tween-20 的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline with Tween-20)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

RT-LAMP:逆转录环介导等温扩增(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification)

RT-PCR:逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction)

RT-qPCR:实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction)

SSC:柠檬酸钠缓冲液(saline sodium citrate)

Taq:水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)

Tris:三羟甲基氨基甲烷(tris hydroxymethyl aminomethane)

tRNA:转运 RNA(transfer RNA)

5 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅适用确认为蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

- 5.1 二甲苯:分析纯。
- 5.2 无水乙醇:分析纯。
- 5.3 95%乙醇:分析纯。
- 5.4 石蜡(熔点 52℃~54℃):切片级。
- 5.5 中性树胶:生化试剂。
- 5.6 琼脂糖:生化试剂。
- 5.7 RNA 保存液:生化试剂。
- 5.8 DEPC 水:按附录 A 中的 A.1 配制。
- 5.9 4%多聚甲醛固定液:按 A.2 配制。
- 5.10 85%乙醇:按 A.3 配制。
- 5.11 80%乙醇:按 A.4 配制。
- 5.12 75%乙醇:按 A.5 配制。
- 5.13 70%乙醇:按 A.6 配制。
- 5.14 50%乙醇:按 A.7 配制。
- 5.15 苏木精染色液:生化试剂。
- 5.16 伊红-焰红染色液:按 A.8 配制。
- 5.17 原位杂交探针:用地高辛标记套式 PCR 第二步扩增的目标序列作为原位杂交的探针,序列见附录 B 中的 B.1。合成时用 DIG 标记的核糖核苷尿嘧啶代替脱氧核糖核苷胸腺嘧啶残基。
- 5.18 组织病理学和原位杂交检测阳性对照为感染 IPV 且有明显病理变化的罗氏沼虾复眼组织切片。
- 5.19 组织病理学和原位杂交检测阴性对照为未感染 IPV 的正常罗氏沼虾复眼组织切片。
- 5.20 蛋白酶 K(20 μg/mL):按 A.9 配制。
- 5.21 1×PBST:按 A.10 配制。
- 5.22 HCl(0.2 mol/L):按 A.11 配制。
- 5.23 无 tRNA 无肝素预杂交液:按 A.12 配制。
- 5.24 tRNA(5 mg/mL):按 A.13 配制。
- 5.25 肝素(5 mg/mL):按 A.14 配制。
- 5.26 预杂交液:按 A.15 配制。
- 5.27 1×马来酸:按 A.16 配制。
- 5.28 10% Blocking Reagent:按 A.17 配制。
- 5.29 Blocking Buffer:按 A.18 配制。
- 5.30 2×SSC:按 A.19 配制。
- 5.31 0.2×SSC:按 A.20 配制。
- 5.32 AP-抗 DIG(0.75 U/mL):按 A.21 配制。
- 5.33 1×AP 反应缓冲液:生化试剂。
- 5.34 BCIP/NBT 显色液:按 A.22 配制。

- 5.35 0.5% 俾斯麦棕 Y:按 A.23 配制。
- 5.36 dNTPs(各 2.5 mmol/L):含 dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 2.5 mmol/L 的混合物,−20 ℃ 保存。
- 5.37 dNTPs(各 10 mmol/L):含 dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 10 mmol/L 的混合物,−20 ℃ 保存。
- 5.38 5×M-MLV 逆转录酶缓冲液:生化试剂,−20 ℃ 保存,或其他等效缓冲液。
- 5.39 M-MLV 逆转录酶(200 U/μL):生化试剂,−20 ℃ 保存,或其他等效逆转录酶。
- 5.40 RNA 酶抑制剂(40 U/μL):生化试剂,−20 ℃ 保存。
- 5.41 随机引物(50 μmol/L):生化试剂,−20 ℃ 保存。
- 5.42 寡聚脱氧胸苷酸引物(50 μmol/L):生化试剂,−20 ℃ 保存。
- 6.43 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL):生化试剂,−20 ℃ 保存,或其他等效 DNA 聚合酶。
- 5.44 Hot-Start *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL):生化试剂,−20 ℃ 保存,或其他等效 DNA 聚合酶。
- 5.45 10×PCR 缓冲液:生化试剂,无 Mg^{2+} ,−20 ℃ 保存。
- 5.46 $MgCl_2$ (25 mmol/L):生化试剂,−20 ℃ 保存。
- 5.47 AMV 逆转录酶(10 U/μL):生化试剂,−20 ℃ 保存,或其他等效逆转录酶。
- 5.48 *Bst* 3.0 DNA 聚合酶(8 U/μL):生化试剂,−20 ℃ 保存。
- 5.49 套式 RT-PCR 两对引物:引物浓度为 10 μmol/L。其中,外侧引物 IPV-F1 和 IPV-R1,扩增 1 038 bp 片段;内侧引物 IPV-F2 和 IPV-R2,扩增 395 bp 片段。引物序列如下:
 引物 IPV-F1:5'-GCA-CAC-TCC-CAA-CAC-GTT-TC-3';
 引物 IPV-R1:5'-CGC-GCG-TAA-TCT-CTA-CAC-CT-3';
 引物 IPV-F2:5'-TCC-CTA-GGC-AGG-GGA-TAC-TG-3';
 引物 IPV-R2:5'-AGC-TAT-CCG-TGG-TGT-GGA-AC-3'。
- 5.50 RT-qPCR 引物和探针:引物和探针浓度均为 10 μmol/L,引物和探针序列如下:
 引物 IPV-F:5'-AGG-AGA-GGG-TTT-TGG-CTT-G-3';
 引物 IPV-R:5'-CTG-GAT-TGG-AAG-GGA-ACT-CTG-3';
 探针 IPV-P:FAM-5'-CCG-CGA-CAC-TTA-CAA-CTG-CCC-TT-3'-TAMRA。
- 5.51 RT-LAMP 引物:配制引物预混液,各引物终浓度分别为 IPV-FIP、IPV-BIP:16 μmol/L,IPV-F3、IPV-B3:2 μmol/L,IPV-LpF:8 μmol/L,−20 ℃ 保存。引物序列如下:
 IPV-FIP:5'-CCTCCTGTGCTTCACTATGACTTTAGACAGCCTCTATCTACTTC-3';
 IPV-BIP:5'-GATATCACGGACGGCGAGTTTATAGCATCAGACAGCGAT-3';
 IPV-F3:5'-GAACCAGTGACTAGACCA-3';
 IPV-B3:5'-TCTGTCATCACATCCACA-3';
 IPV-LpF:5'-TGTGACAATCGCCATAACA-3'。
- 5.52 套式 RT-PCR、RT-qPCR 和 RT-LAMP 检测阳性对照:感染 IPV 的虾组织或含有目的片段的核酸,−80 ℃ 保存。
- 5.53 套式 RT-PCR、RT-qPCR 和 RT-LAMP 检测阴性对照:不含 IPV 的虾组织,−80 ℃ 保存。
- 5.54 套式 RT-PCR、RT-qPCR 和 RT-LAMP 检测空白对照:可用 DEPC 水作为空白对照。
- 5.55 50×电泳缓冲液:按 A.24 配制。
- 5.56 1×电泳缓冲液:按 A.25 配制。
- 5.57 6×载样缓冲液:生化试剂,或其他等效载样缓冲液。
- 5.58 DNA 分子量标准:生化试剂。
- 5.59 电泳核酸染料:生化试剂。
- 5.60 2×RT-LAMP 预混物:按 A.26 配制。

6 仪器设备

- 6.1 微量移液器:量程 0.5 μL ~10 μL 、10 μL ~100 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1000 μL ,应按洁净区、样品区、扩增区和电泳区各配一套。
- 6.2 高速冷冻离心机:4 $^{\circ}\text{C}$ 转速 12 000 g 以上。
- 6.3 普通冰箱:具冷藏室,并带-18 $^{\circ}\text{C}$ 及以下冷冻箱体。
- 6.4 超低温冰箱:-80 $^{\circ}\text{C}$ 及以下。
- 6.5 普通 PCR 仪。
- 6.6 荧光定量 PCR 仪:具有 FAM 荧光信号采集系统和计算机分析处理系统。
- 6.7 电泳仪:输出直流电压 0 V~400 V。
- 6.8 水平电泳槽:50 mL~500 mL,带有 5 cm~20 cm 宽度的凝胶船及相应的样孔梳。
- 6.9 紫外观察仪或凝胶成像仪:可遮挡可见光干扰,在 200 nm~230 nm 波长对凝胶发射紫外线。
- 6.10 组织脱水机。
- 6.11 包埋机。
- 6.12 染色机。
- 6.13 展片机。
- 6.14 平板烘片机。
- 6.15 超薄切片机。
- 6.16 光学显微镜。
- 6.17 杂交炉。

7 临床症状

主要表现为性腺发育提前、生长缓慢、脱壳延缓、甲壳颜色深和活力弱,并具有传染性的特征;养殖 60 d~80 d,体长仅为 5 cm~7 cm 时出现副性征,如雌虾抱卵,雄虾第二步足变长,典型病例可超过体长 1.5 倍以上,第二步足前端出现淡黄色甚至蓝色的指节,指关节外侧有绒毛。见附录 B。

8 样品

8.1 对象

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)等易感宿主。

8.2 数量、方法和保存运输

符合 GB/T 28630.4—2012 中附录 B 的要求。

8.3 器官或组织

8.3.1 组织病理学 and 原位杂交检测时,优先采集眼柄和头胸甲。

8.3.2 套式 RT-PCR、RT-qPCR 和 RT-LAMP 检测时,仔虾采集除眼球外的完整个体;幼虾至成虾阶段采集去除眼球的眼柄、脑、鳃、胸神经节、步足;亲虾的非致死检测采集步足或去除眼球的眼柄。

9 组织病理学检测

9.1 样品处理和准备

9.1.1 取样时,迅速将组织切成厚度为 1 mm~3 mm 的组织块,采用 4%多聚甲醛固定液进行固定。

9.1.2 样品固定方法和切片前的取材修整应符合 GB/T 28630.4—2012 中附录 B 的要求。

9.2 脱水

将样本依次放入 75%乙醇(1 次,1 h 45 min)→85%乙醇(2 次,1 h 45 min/次)→95%乙醇(2 次,

45 min/次)→无水乙醇(2次,45 min/次)。

9.3 透明

将样本依次放入无水乙醇和二甲苯的混合溶液(体积比1:1)(1次,25 min)→二甲苯(2次,20 min/次)。

9.4 浸蜡

将样本放入纯石蜡(2次,1 h 20 min/次)。

9.5 包埋

用包埋机进行包埋。

9.6 切片

用切片机切片,厚度5 μm 。对每个石蜡包埋块至少切取两块不连续的切片。

9.7 展片

展片机(40 $^{\circ}\text{C}$)中展片,用涂有一层粘片剂的载玻片捞出,置于平板烘片机45 $^{\circ}\text{C}$ 烘片2 h。

9.8 染色

将切片依次放入二甲苯(2次,5 min/次)→无水乙醇(2次,2 min/次)→95%乙醇(2次,2 min/次)→80%乙醇(2次,2 min/次)→50%乙醇(1次,2 min)→蒸馏水(3次,2 min/次)→苏木精染色液(1次,5 min)→缓慢流动的自来水(1次,6 min)→伊红-焰红染色液(1次,2 min)→95%乙醇(2次,2 min/次)→无水乙醇(2次,2 min/次)→二甲苯(3次,2 min 30 s/次)。

9.9 封片

滴加2滴中性树胶封片。

9.10 观察

光学显微镜下观察。

9.11 结果判定

9.11.1 检测样品复眼中半椭球体的球状细胞,神经节层、束状带、窦腺、洋葱体中的细胞内观察到细胞质嗜酸性包涵体,判定组织病理学检测结果为阳性,组织病理学图例见附录C中图C.1~图C.3。

9.11.2 检测样品未观察到上述嗜酸性包涵体,判定组织病理学检测结果为阴性,组织病理学图例见图C.4~图C.6。

10 原位杂交检测

10.1 样品处理和准备

按9.1操作。

10.2 组织切片制备

按9.2~9.7的步骤制备组织切片。

10.3 探针杂交

10.3.1 组织切片(包括阴性对照和阳性对照)依次通过二甲苯(3次,10 min/次)、无水乙醇(2次,5 min/次)、95%乙醇(1次,5 min)、85%乙醇(1次,5 min)、70%乙醇(1次,5 min)、50%乙醇(1次,5 min),然后用蒸馏水冲洗(2次,3 min/次)。

10.3.2 将切片放入预冷到4 $^{\circ}\text{C}$ 的4%多聚甲醛固定液中浸泡10 min。

10.3.3 室温下,用1×PBS冲洗组织切片1次,浸泡3次,每次5 min。

10.3.4 室温下,用0.2 mol/L HCl浸洗组织切片20 min。

10.3.5 室温下,用1×PBST冲洗组织切片2次,浸洗3次,每次10 min。

10.3.6 将切片放入预热到37 $^{\circ}\text{C}$ 的20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白酶K溶液中,浸洗30 min。

10.3.7 室温下,用1×PBST冲洗组织切片2次,浸洗3次,每次5 min。

10.3.8 将2×SSC倒入切片盒提供潮湿环境,将切片从杂交缸转入切片盒,吸500 μL 预杂交液(5.26)于每张组织切片上,放入杂交炉中42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育3.5 h。

- 10.3.9 按 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的浓度将探针和相应量的预杂交液(5.26)混合, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min , 然后置于冰上淬冷。吸 $500\text{ }\mu\text{L}$ 混合后预杂交液于每张组织切片上, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h 。
- 10.3.10 在切片上滴加 1 mL $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热的无 tRNA 无肝素预杂交液: $2\times\text{SSC}$ (体积比 $1:1$) 混合液, 保温孵育 15 min 。
- 10.3.11 将切片转入杂交缸, 分别用 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热的 $2\times\text{SSC}$ 、 $0.2\times\text{SSC}$ 浸洗组织切片 1 次, 每次 30 min 。
- 10.3.12 室温下, $1\times$ 马来酸浸洗组织切片 5 min 。
- 10.3.13 将切片转入切片盒, 每张切片加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ Blocking Buffer, 室温孵育 4 h 。
- 10.3.14 每张切片滴加 $500\text{ }\mu\text{L}$ AP-抗 DIG(0.75 U/mL), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h 。
- 10.3.15 室温下, 将切片转入杂交缸中, 用 $1\times\text{PBST}$ 冲洗 2 次, 浸洗 6 次, 每次 15 min 。
- 10.3.16 将切片转入切片盒中, 用 $1\times\text{AP}$ 缓冲液浸润 2 次, 每次 10 min 。
- 10.3.17 每张切片各加 $200\text{ }\mu\text{L}$ BCIP/NBT 显色液, 室温下黑暗中放置 $0.5\text{ h}\sim 3\text{ h}$, 中间可取出短时间在显微镜下观察显色情况。当阳性对照有杂交信号出现, 且颜色较好时可终止反应。如果阴性对照的组织细胞开始普遍出现非特异性染色, 则应立即终止染色。
- 10.3.18 将切片上显色液倒掉, 并将切片转入杂交缸, 先 PBST 冲洗 2 次 ~ 5 次, 后浸洗 6 次, 每次 5 min 。
- 10.3.19 终止显色后, 可将切片置于 PBST 中并放于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 10.3.20 将切片取出, 用蒸馏水轻轻冲洗干净后, 用 0.5% 俾斯麦棕 Y 染色 $2\text{ min }30\text{ s}$ 后, 用蒸馏水冲洗干净。
- 10.3.21 脱水: 按下列梯度依次浸泡切片, 将切片脱水: 50% 乙醇(1 次, 3 min)、 70% 乙醇(1 次, 3 min)、 95% 乙醇(3 次, 1 min/次)、无水乙醇(3 次, 1 min/次)、二甲苯(4 次, 1 min/次)。滴加 2 滴中性树脂, 封片。
- 10.3.22 光学显微镜观察, 寻找蓝黑色的细胞内沉淀物并拍照。
- 10.4 结果判定
- 10.4.1 阳性对照样品靶组织中观察到明显的蓝黑色杂交信号, 阴性对照样品组织中未观察到任何的蓝黑色杂交信号, 实验有效。
- 10.4.2 检测样品组织中观察到蓝黑色杂交信号(见附录 D 中的图 D.1 $\sim$ 图 D.3), 判定原位杂交检测结果为阳性。
- 10.4.3 检测样品组织中未观察到明显蓝黑色杂交信号(见图 D.4), 判定原位杂交检测结果为阴性。

11 套式 RT-PCR 检测

11.1 样品的处理和准备

在样品处理区进行取样, 立即进行 RNA 提取操作或加入相应体积 RNA 保存液暂存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下。

11.2 RNA 提取

11.2.1 取 $30\text{ mg}\sim 50\text{ mg}$ 组织, 按 GB/T 40257—2021 中 8.1 的方法提取总 RNA。

11.2.2 可采用同等抽提效果的其他方法或商品化 RNA 提取试剂盒。

11.3 cDNA 合成

11.3.1 在洁净区, 于冰盒上配制逆转录酶混合物, 配制方法为: $4\text{ }\mu\text{L}$ $5\times\text{M-MLV}$ 逆转录酶缓冲液、 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ RNA 酶抑制剂($40\text{ U}/\mu\text{L}$)和 $1\text{ }\mu\text{L}$ M-MLV 逆转录酶($200\text{ U}/\mu\text{L}$), 加入 $4.5\text{ }\mu\text{L}$ DEPC 水补至 $10\text{ }\mu\text{L}$, 混匀。待检样品较多时宜批量配制逆转录酶混合物, 然后分装到逆转录反应管中。

11.3.2 在洁净区, 于冰盒上配制 RNA 预变性体系, 分装为 $5\text{ }\mu\text{L}/\text{管}$, 使每反应管含 $3\text{ }\mu\text{L}$ DEPC 水、 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 随机引物($50\text{ }\mu\text{mol/L}$)、 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 寡聚脱氧胸苷酸引物($50\text{ }\mu\text{mol/L}$)和 $1\text{ }\mu\text{L}$ dNTPs(10 mmol/L), 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。临用前, 在加样区向配制的 RNA 预变性体系中加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ 含量为 $0.5\text{ }\mu\text{g}\sim 1\text{ }\mu\text{g}$ 的待测总

RNA 样品。65 ℃预变性 5 min 后,立即放入冰盒中冷却 2 min。同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

11.3.3 将 11.3.1 的预混物加至 11.3.2 样品管中,稍离心,42 ℃反应 45 min,95 ℃继续反应 5 min 后,可获得 cDNA 模板。也可采用等效的商品化 cDNA 合成试剂盒,或在 11.4.1 中采用等效的商品化一步法 RT-PCR 试剂盒,省略 cDNA 合成的步骤。

11.4 套式 RT-PCR 扩增

11.4.1 套式 RT-PCR 反应体系:套式 RT-PCR 反应体系的配制应在洁净区完成。宜根据检测工作量需要配置 100 份~1 000 份反应预混液,100 份第一轮 PCR 反应体系组成见表 1。加入除 *Taq* DNA 聚合酶和 cDNA 模板以外的各项试剂,在冰盒上配制成套式 RT-PCR 中第一轮 PCR 的无酶大体积预混物,充分混匀,分装保存于-20 ℃,临用前,加入相应体积的 *Taq* DNA 聚合酶,混匀,按 1 份/支分装到 0.2 mL PCR 管中。反应前,加入相应体积的模板量,混匀,其中,25 μL 体系加模板量 1 μL/反应管;50 μL 体系模板量 2 μL/反应管;100 μL 体系模板量 4 μL/反应管。

表 1 第一轮 PCR 反应预混液(100 份)所需试剂组成

成分	25 μL 体系	50 μL 体系	100 μL 体系	试剂终浓度
10×PCR 缓冲液(无 Mg ²⁺)	250 μL	500 μL	1 000 μL	1×
MgCl ₂ (25 mmol/L)	200 μL	400 μL	800 μL	2 mmol/L
dNTPs(各 2.5 mmol/L)	200 μL	400 μL	800 μL	200 μmol/L
IPV-F1(10 μmol/L)	100 μL	200 μL	400 μL	0.4 μmol/L
IPV-R1(10 μmol/L)	100 μL	200 μL	400 μL	0.4 μmol/L
无菌双蒸水	1540 μL	3 080 μL	6 160 μL	—
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/μL)	10 μL	20 μL	40 μL	0.02 U/μL
100 份反应预混物总体积	2 400 μL	4 800 μL	9 600 μL	—

11.4.2 在加样区将 cDNA 模板放入上述第一轮 PCR 预混液的 PCR 管中,混匀,送入扩增区按以下步骤进行第一轮 PCR 扩增:94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 65 s,30 个循环;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保温。

11.4.3 第二轮 PCR 反应体系的配制应在洁净区完成,宜根据检测工作量需要配置 100 份~1 000 份反应预混液,100 份第二轮 PCR 反应体系组成见表 2。在冰盒上配制第二轮 PCR 的无酶大体积预混物,充分混匀,分装保存于-20 ℃,临用前,加入相应体积的 *Taq* DNA 聚合酶,混匀,按 1 份/支分装到 0.2 mL PCR 管中。反应前,在扩增区将第一轮反应产物作为第二轮 PCR 反应的模板加入到第二轮 PCR 预混物 PCR 管中,混匀,其中,25 μL 体系加模板量 1 μL/反应管;50 μL 体系模板量 2 μL/反应管;100 μL 体系模板量 4 μL/反应管。扩增程序为 94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保温。准备进行产物电泳。

表 2 第二轮 PCR 反应预混液(100 份)所需试剂组成

成分	25 μL 体系	50 μL 体系	100 μL 体系	试剂终浓度
10×PCR 缓冲液(无 Mg ²⁺)	250 μL	500 μL	1 000 μL	1×
MgCl ₂ (25 mmol/L)	200 μL	400 μL	800 μL	2 mmol/L
dNTPs(各 2.5 mmol/L)	200 μL	400 μL	800 μL	200 μmol/L
IPV-F2(10 μmol/L)	100 μL	200 μL	400 μL	0.4 μmol/L
IPV-R2(10 μmol/L)	100 μL	200 μL	400 μL	0.4 μmol/L
无菌双蒸水	1 540 μL	3 080 μL	6 160 μL	—
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/μL)	10 μL	20 μL	40 μL	0.02 U/μL
100 份反应预混物总体积	2 400 μL	4 800 μL	9 600 μL	—

11.5 琼脂糖凝胶电泳

11.5.1 使用 1×电泳缓冲液配制 1.5%的琼脂糖凝胶,待凝胶冷却至低于 60 ℃时,按比例加入核酸染料,摇匀,制备琼脂糖凝胶。

11.5.2 在电泳区将 5 μL PCR 反应产物与 1 μL 6×载样缓冲液混匀后加入到加样孔中,也可采用其他

商品化 PCR 缓冲液(含电泳指示剂)直接加入到加样孔,同时设置 DNA 分子量标准对照。

11.5.3 加好样品的琼脂糖凝胶在 $1\times$ 电泳缓冲液中 $4\text{ V/cm}\sim 5\text{ V/cm}$ 的电压下电泳。当载样缓冲液中的溴酚蓝指示剂的色带迁移至琼脂糖凝胶的 $2/3$ 处时停止电泳,将凝胶置于紫外观察仪或凝胶成像仪下观察或拍照。

11.5.4 若观察到预期大小的扩增片段,对 PCR 产物进行测序。

11.6 结果判定

11.6.1 阳性对照第一轮 PCR 扩增在 $1\ 038\text{ bp}$ 附近有特异性目的条带,且第二轮 PCR 扩增在 395 bp 附近有特异性目的条带,同时阴性对照和空白对照均无上述特异性目的条带,实验有效;否则实验无效,应重新进行实验。

11.6.2 样品的第一轮 PCR 扩增在 $1\ 038\text{ bp}$ 附近有特异性目的条带,或样品的第二轮 PCR 扩增在 395 bp 附近有特异性目的条带,且扩增产物序列与传染性早熟病毒的参考序列(见附录 E)一致性(Identities) $\geq 95\%$,判定套式 RT-PCR 检测结果为阳性。

11.6.3 样品的第一轮 PCR 扩增在 $1\ 038\text{ bp}$ 附近无特异性目的条带且第二轮 PCR 扩增在 395 bp 附近无特异性目的条带,或 PCR 产物测序结果与传染性早熟病毒的参考序列(见附录 E)一致性(Identities) $< 95\%$,则判定套式 RT-PCR 检测结果为阴性。

12 RT-qPCR 检测

12.1 样品的处理和准备

按 11.1 操作。

12.2 RNA 提取

按 11.2 操作。

12.3 反应体系配制

按照表 3 要求,在洁净区于冰盒上配制成 RT-qPCR 的大体积预混物,宜根据检测工作量需要配制 100 份 $\sim$ 1000 份反应预混液,100 份 RT-qPCR 反应体系组成见表 3。试剂及反应混合物在操作时务必始终置于冰盒中保持低温状态;应设置以 DEPC 水为模板的空白对照。加样时在加样区按照空白对照、阴性对照、待检样品、阳性对照的顺序分别加入 $1\ \mu\text{L}$ 模板,轻弹混匀,并立即置于冰盒中,不应让反应体系自然升温。

反应体系配制也可采用同等效果的商业化 RT-qPCR 试剂盒代替。

表 3 RT-qPCR 的反应预混物(100 份)所需试剂

成分	25 μL 体系	试剂终浓度
$10\times$ PCR 缓冲液(无 Mg^{2+})	250 μL	$1\times$
MgCl_2 (25 mmol/L)	200 μL	2 mmol/L
dNTPs(各 2.5 mmol/L)	400 μL	400 $\mu\text{mol/L}$
IPV-F(10 $\mu\text{mol/L}$)	100 μL	0.4 $\mu\text{mol/L}$
IPV-R(10 $\mu\text{mol/L}$)	100 μL	0.4 $\mu\text{mol/L}$
IPV-P(10 $\mu\text{mol/L}$)	50 μL	0.2 $\mu\text{mol/L}$
AMV 逆转录酶(10 U/ μL)	50 μL	0.2 U/ μL
RNA 酶抑制剂(40 U/ μL)	30 μL	0.48 U/ μL
DEPC 水	1 120 μL	—
Hot-Start Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL)	100 μL	0.2 U/ μL
100 份反应预混物总体积	2 400 μL	—

12.4 反应条件

将加好模板的 PCR 管从冰盒中直接移到预热的实时荧光定量 PCR 仪中,反应程序为: $50\text{ }^\circ\text{C}\ 15\text{ min}$; $95\text{ }^\circ\text{C}\ 5\text{ min}$; $95\text{ }^\circ\text{C}\ 10\text{ s}$, $60\text{ }^\circ\text{C}\ 30\text{ s}$,共 40 个循环。

12.5 结果判定

- 12.5.1 若阴性对照 C_t 值 >37 且无典型“S”形扩增曲线,阳性对照 C_t 值 ≤ 37 ,并出现典型“S”形扩增曲线,则判定实验有效。否则试验无效,应重新进行实验。
- 12.5.2 若样品的 C_t 值 ≤ 37 ,且出现典型“S”形扩增曲线,则判定 RT-qPCR 检测结果为阳性。
- 12.5.3 若 $37 < \text{样品的 } C_t \text{ 值} \leq 40$ 时,应对样品再次检测。再次检测时加入 $5\ \mu\text{L}$ 模板,并相应减少 DEPC 水的体积,若再次检测样品的 C_t 值 ≤ 37 ,且出现典型的“S”形扩增曲线,判定 RT-qPCR 检测结果为阳性,否则判定为阴性。
- 12.5.4 若样品无典型“S”形扩增曲线,结果判定 RT-qPCR 检测结果为阴性。

13 RT-LAMP 检测

13.1 样品的处理和准备

按 11.1 操作。

13.2 RNA 提取

按 11.2 操作。

13.3 反应体系配制

按照表 4 要求,在洁净区于冰盒上配制成 RT-LAMP 的大体积预混物,宜根据检测工作量需要配置 100 份~1 000 份反应预混物,100 份 RT-LAMP 反应预混物配制见表 4。于冰盒上在加样区向各 PCR 管中加入 $23\ \mu\text{L}$ 表 4 中的 RT-LAMP 预混物,再按照空白对照、阴性对照、待检样品、阳性对照的顺序分别加入 $2\ \mu\text{L}$ RNA 模板,轻弹混匀,并立即置于冰盒中,不应让反应体系自然升温。

也可采用等效的商品化 RT-LAMP 试剂盒。

表 4 RT-LAMP 的反应预混物(100 份)所需试剂

成分	25 μL 体系	试剂终浓度
2 $\times$ RT-LAMP 预混物	1 250 μL	1 $\times$
RT-LAMP 引物预混液	250 μL	1 $\times$
<i>Bst</i> 3.0 DNA 聚合酶(8 U/ μL)	100 μL	0.32 U/ μL
AMV 逆转录酶(10 U/ μL)	50 μL	0.2 U/ μL
DEPC 水	650 μL	—
100 份反应预混物总体积	2 300 μL	—

13.4 反应条件

将 PCR 管移入荧光定量 PCR 仪中。反应程序为:64 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,60 个循环。每次循环收集一次 FAM 通道荧光信号。循环结束后,确定 C_t 值。

13.5 结果判定

- 13.5.1 若阴性对照和空白对照无 C_t 值或 C_t 值 >45 且无典型“S”形扩增曲线,阳性对照 C_t 值 ≤ 30 ,并出现典型“S”形扩增曲线,则判定试验有效;否则试验无效,应重新进行试验。
- 13.5.2 若样品的 C_t 值 ≤ 30 ,且出现典型“S”形扩增曲线,则判定 RT-LAMP 检测结果为阳性。
- 13.5.3 若 $30 < \text{样品的 } C_t \text{ 值} \leq 45$ 时,应对样品再次检测。再次检测时加入 $5\ \mu\text{L}$ 模板,并相应减少 DEPC 水的体积,若再次检测样品的 C_t 值 ≤ 30 ,且出现典型的“S”形扩增曲线,判定 RT-LAMP 检测结果为阳性,否则判定为阴性。
- 13.5.4 若样品无典型“S”形扩增曲线,结果判定 RT-LAMP 检测结果为阴性。

14 综合判定

14.1 疑似病例的判定

易感宿主符合以下任何一项,判定为疑似病例:
——表现出典型的临床症状;

- 组织病理学检测结果为阳性；
- 原位杂交检测结果为阳性；
- 套式 RT-PCR 检测结果为阳性；
- RT-qPCR 检测结果为阳性；
- RT-LAMP 检测结果为阳性。

14.2 确诊病例的判定

易感宿主样品的套式 RT-PCR 和/或 RT-qPCR 和/或 RT-LAMP 和/或原位杂交检测结果为阳性,且符合以下任何一项,判定为确诊病例:

- 表现出典型的临床症状;
- 具有典型的组织病理学特征。

14.3 阴性病例的判定

易感宿主不具有典型临床症状和组织病理学特征,且套式 RT-PCR 和/或 RT-qPCR 和/或 RT-LAMP 和/或原位杂交检测结果为阴性,判定为阴性病例。

附 录 A
(规范性)
试剂及其配制

A.1 DEPC 水

RNA 酶去除剂	1 mL
水	1 000 mL

充分搅拌均匀,灭菌两次后室温保存。

A.2 4%多聚甲醛固定液

多聚甲醛	40 g
1×PBS	900 mL

加热到 60 ℃,搅拌至多聚甲醛固体溶解后,加 1×PBS 定容至 1 000 mL,4 ℃保存。

A.3 85%乙醇

95%乙醇	850 mL
加 DEPC 水定容至	950 mL

混匀,室温储存。

A.4 80%乙醇

95%乙醇	800 mL
加 DEPC 水定容至	950 mL

混匀,室温储存。

A.5 75%乙醇

95%乙醇	750 mL
加 DEPC 水定容至	950 mL

混匀,室温储存。

A.6 70%乙醇

95%乙醇	700 mL
加 DEPC 水定容至	950 mL

混匀,室温储存。

A.7 50%乙醇

95%乙醇	500 mL
加 DEPC 水定容至	950 mL

混匀,室温储存。

A.8 伊红-焰红染色液

1%伊红染色液	1%焰红染色液
95%乙醇	10 mL

冰醋酸	780 mL
100 mL	4 mL
混匀后即可使用,室温储存。	

A.9 蛋白酶 K(20 µg/mL)

20 mg/mL 蛋白酶 K	50 µL
加 DEPC 水定容至	50 mL
混匀,现用现配。	

A.10 1×PBST

Tween-20	1 mL
1×PBS	1 000 mL
充分搅拌均匀,室温储存。	

A.11 HCl(0.2 mol/L)

浓盐酸	833 µL
加 DEPC 水定容至	50 mL
混匀,室温储存。	

A.12 无 tRNA 无肝素预杂交液

去离子甲酰胺	25 mL
20×SSC	12.5 mL
Tween-20	50 µL
1 mol/L 柠檬酸	460 µL
DEPC 水	10 mL
按上述顺序混匀即可使用,−20 ℃ 储存。	

A.13 tRNA(5 mg/mL)

tRNA	5 mg
DEPC 水	1 mL
混匀,−20 ℃ 储存。	

A.14 肝素(5 mg/mL)

肝素	5 mg
DEPC 水	1 mL
混匀,−20 ℃ 储存。	

A.15 预杂交液

无 tRNA 无肝素预杂交液	5 mg/mL 肝素
1 mL	100 µL
5 mg/mL tRNA	10 µL
按上述顺序混匀即可使用,现用现配。	

A.16 1×马来酸

顺丁烯二酸	2.32 g
-------	--------

氢氧化钠	1.752 g
氯化钠	1.58 g
DEPC 水	200 mL
按上述顺序混匀即可使用,室温储存。	

A. 17 10% Blocking Reagent

Blocking Reagent	3 g
加 1×马来酸至总质量为	30 g
高温溶解,−20 ℃ 储存。	

A. 18 Blocking Buffer

1×马来酸	7 mL
山羊血清	1 mL
10% Blocking Reagent	2 mL
按上述顺序混匀,现用现配。	

A. 19 2×SSC

20×SSC	10 mL
DEPC 水	90 mL
按上述顺序混匀,现用现配。	

A. 20 0.2×SSC

2×SSC	10 mL
DEPC 水	90 mL
室温储存。	

A. 21 AP-抗 DIG(0.75 U/mL)

AP-抗 DIG(0.75 U/μL)	1 μL
Blocking Buffer	1 mL
按上述顺序混匀,现用现配。	

A. 22 BCIP/NBT 显色液

1×AP 反应缓冲液	1 mL
25×NBT	40 μL
25×BCIP	40 μL
按上述顺序混匀,现用现配。	

A. 23 0.5% 俾斯麦棕 Y

俾斯麦棕 Y	2.5 g
水	500 mL
把染料溶于水中,过滤。室温储存。	

A. 24 50×电泳缓冲液

Tris	242 g
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	100 mL

冰乙酸	57.1 mL
加水定容至	1 000 mL
室温储存。	

A. 25 1×电泳缓冲液

50×电泳缓冲液	20 mL
加水定容至	1 000 mL
室温储存。	

A. 26 2×RT-LAMP预混物

1 mol/L Tris-HCl(pH 8.8)	4 mL
100 mmol/L MgSO ₄	14 mL
1 mol/L KCl	2 mL
2 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄	1 mL
Triton X-100	0.2 mL
10 mmol/L dNTPs	28 mL
5 mol/L 甜菜碱	32 mL
5 mmol/L SYTO 9 绿色荧光核酸染料	8 μL
加水溶解,定容至	100 mL
混匀后,−20 ℃储存。	

附 录 B
(资料性)
传染性早熟病毒感染

B.1 发生和流行情况

自 2010 年开始,江苏、浙江、广东等地的罗氏沼虾养殖业出现以性早熟、甲壳硬和生长缓慢为主要特征的铁虾综合征(俗称“铁虾”或“铁壳虾”)。2013—2020 年罗氏沼虾“铁虾”发生比例居高不下,严重制约了罗氏沼虾养殖业的绿色高质量发展。实验室研究发现,罗氏沼虾仔虾(体长约为 0.6 cm)可通过含 IPV 的水体浸浴进行感染。近年来,在日本沼虾(*M. nipponense*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和斑节对虾(*Penaeus monodon*)等虾类中也检出了 IPV。

B.2 病原特征

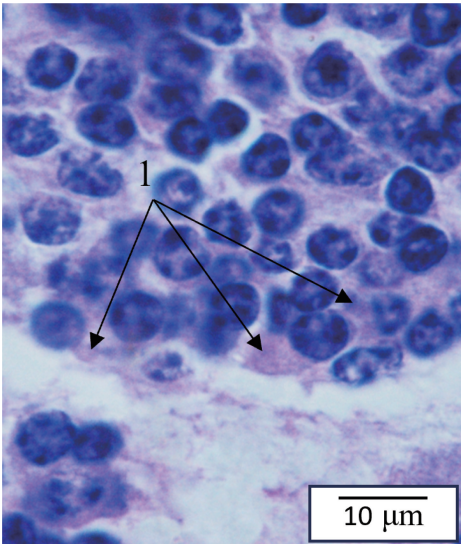
传染性早熟病毒属于黄病毒科(*Flaviviridae*),与荆门病毒(Jingmenvirus)和黄病毒属(*Flavivirus*)病毒的亲缘关系较近,其基因组为正义单链 RNA,全长 12 630 nt 左右,含有两个独立的开放阅读框。病毒粒子呈球形,直径 40 nm~60 nm。

附 录 C

(资料性)

传染性早熟病毒感染罗氏沼虾组织的病理特征图例

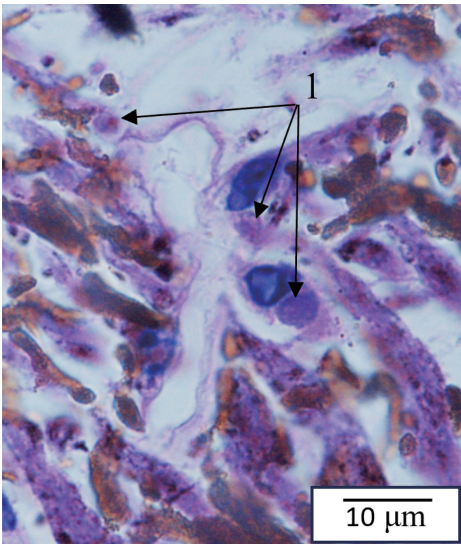
传染性早熟病毒感染罗氏沼虾复眼组织半椭球体中的病理特征见图 C. 1, 传染性早熟病毒感染罗氏沼虾复眼组织束状带中的病理特征见图 C. 2, 传染性早熟病毒感染罗氏沼虾复眼组织神经节层中的病理特征见图 C. 3, 正常罗氏沼虾复眼组织半椭球体中的球状细胞见图 C. 4, 正常罗氏沼虾复眼组织束状带中的细胞见图 C. 5, 正常罗氏沼虾复眼组织神经节层中的细胞见图 C. 6。



标引序号说明：

1——细胞质嗜酸性包涵体。

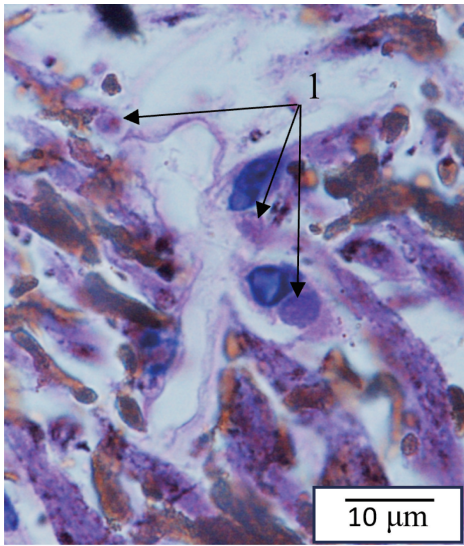
图 C. 1 传染性早熟病毒感染罗氏沼虾复眼组织半椭球体中的病理特征



标引序号说明：

1——细胞质嗜酸性包涵体。

图 C. 2 传染性早熟病毒感染罗氏沼虾复眼组织束状带中的病理特征



标引序号说明：
1——细胞质嗜酸性包涵体。

图 C.3 传染性早熟病毒感染罗氏沼虾复眼组织神经节层中的病理特征

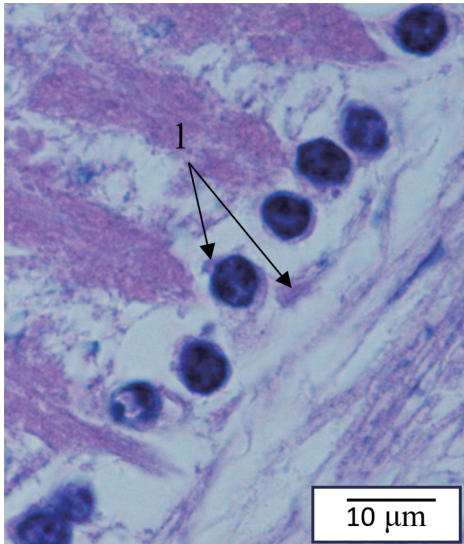


图 C.4 正常罗氏沼虾复眼组织半椭球体中的球状细胞

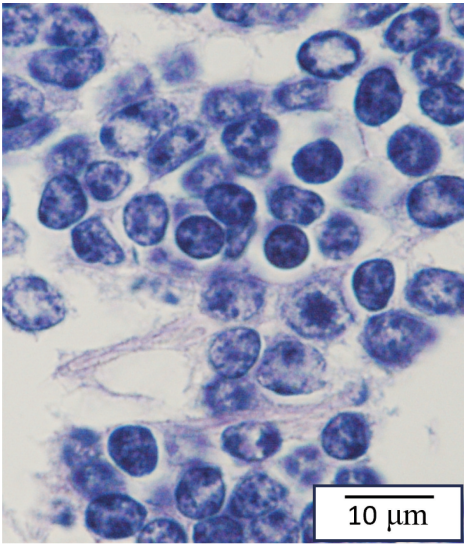


图 C.5 正常罗氏沼虾复眼组织束状带中的细胞

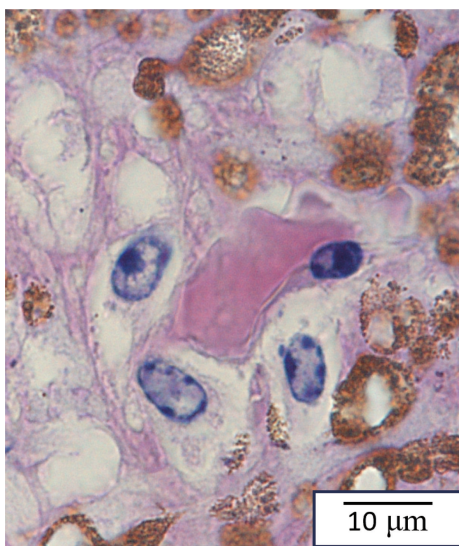


图 C.6 正常罗氏沼虾复眼组织神经节层中的细胞

附 录 D
(资料性)

传染性早熟病毒感染罗氏沼虾的原位杂交特征图例

传染性早熟病毒感染罗氏沼虾复眼组织半椭球体球状细胞原位杂交特征见图 D. 1, 传染性早熟病毒感染罗氏沼虾复眼组织束状带细胞原位杂交特征见图 D. 2, 传染性早熟病毒感染罗氏沼虾复眼组织神经节层细胞原位杂交特征见图 D. 3, 正常罗氏沼虾复眼原位杂交玻片的整体视图见图 D. 4。

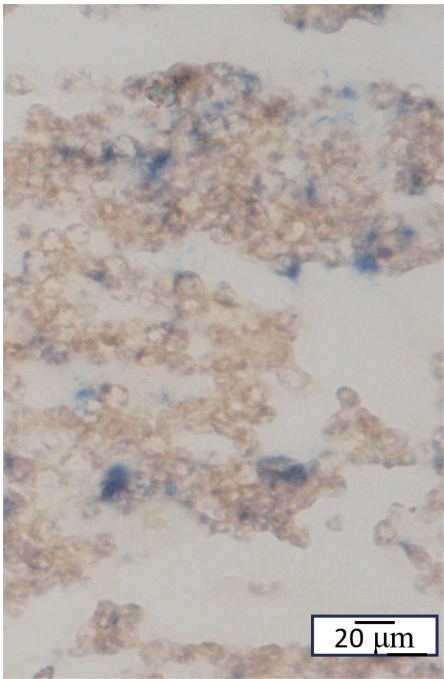


图 D. 1 传染性早熟病毒感染罗氏沼虾复眼组织半椭球体球状细胞原位杂交特征

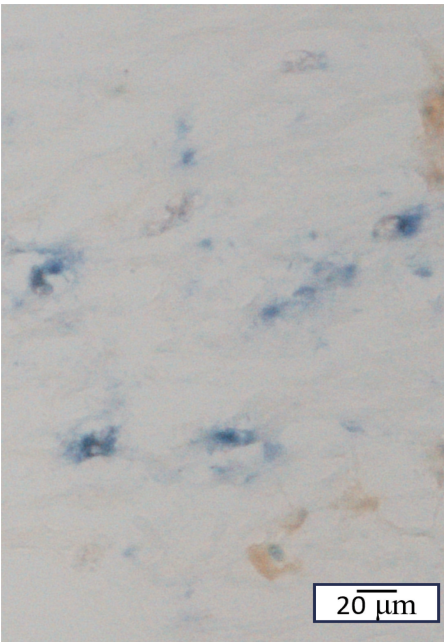


图 D. 2 传染性早熟病毒感染罗氏沼虾复眼组织束状带细胞原位杂交特征

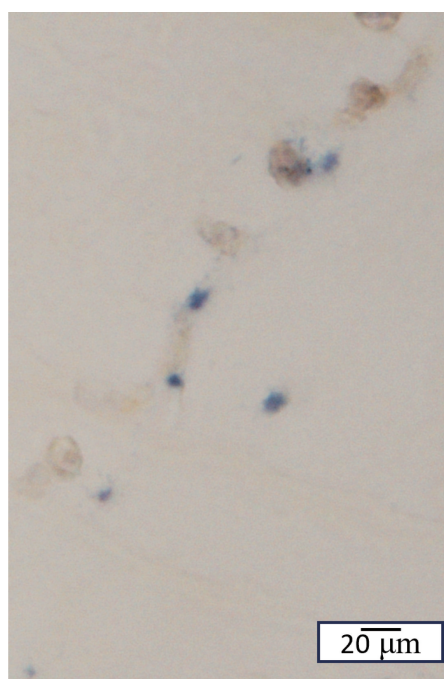


图 D.3 传染性早熟病毒感染罗氏沼虾复眼组织神经节层细胞原位杂交特征



图 D.4 正常罗氏沼虾复眼原位杂交玻片的整体视图

附 录 E
(资料性)

传染性早熟病毒检测方法检测产物序列

E.1 套式 RT-PCR 引物设计及其在靶基因中的位置

见表 E.1 和图 E.1。

表 E.1 传染性早熟病毒套式 RT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列	产物长度
IPV-F1	5'-GCACACTCCCAACACGTTTC-3'	1 038 bp
IPV-R1	5'-CGCGCGTAATCTCTACACCT-3'	
IPV-F2	5'-TCCCTAGGCAGGGGATACTG-3'	395 bp
IPV-R2	5'-AGCTATCCGTGGTGTGGAAC-3'	



图 E.1 套式 RT-PCR 引物在 IPV 靶基因中的位置

E.2 RT-qPCR 引物设计及其在靶基因中的位置

见表 E.2 和图 E.2。

表 E.2 IPV qPCR 引物和探针

引物名称	引物序列	产物长度
IPV-F	5'-AGGAGAGGGTTTTGGCTTG-3'	140 bp
IPV-R	5'-CTGGATTGGAAGGGAACCTCTG-3'	
IPV-P	5'-CCGCGACACTTACAACCTGCCCTT-3'	

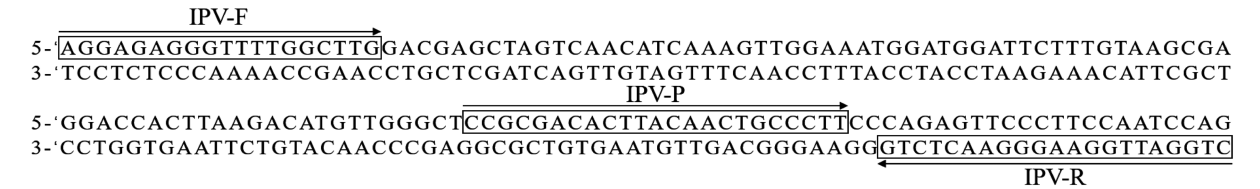


图 E.2 实时荧光定量 PCR 引物在 IPV 靶基因中的位置

E.3 RT-LAMP 引物设计及其在靶基因中的位置

见表 E.3 和图 E.3。

表 E.3 IPV-LAMP 引物 and 探针

引物名称	引物序列
IPV-FIP	5'-CCTCCTGTGCTTCACTATGACTTTAGACAGCCTCTATCTACTTC-3'
IPV-BIP	5'-GATATCACGGACGCGAGTTTATAGCATCAGACAGCGAT-3'
IPV-F3	5'-GAACCAGTGACTAGACCA-3'
IPV-B3	5'-TCTGTCATCACATCCACA-3'
IPV-LpF	5'-TGTGACAATCGCCATAACA-3'

注:IPV-FIP 由 IPV-F1c + TTT + IPV-F2 组成,IPV-BIP 由 IPV-B1c + T + IPV-B2 组成。

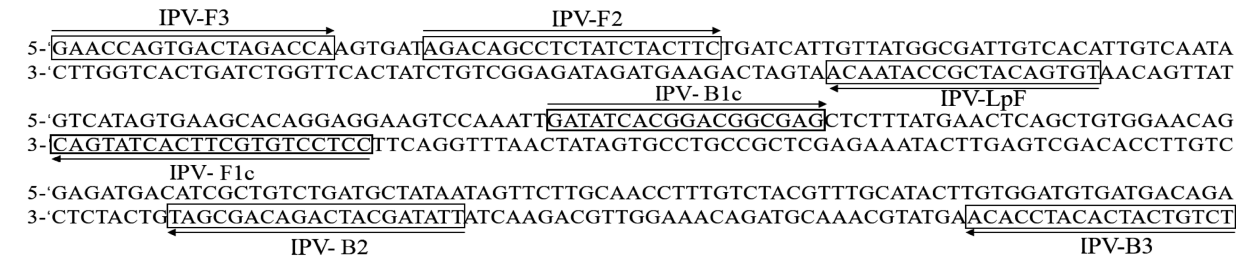


图 E.3 RT-LAMP 引物在 IPV 靶基因中的位置

E.4 原位杂交引物设计

原位杂交探针引物为 IPV-F2/IPV-R2。