

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03125202.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年3月1日

[11] 授权公告号 CN 1243981C

[22] 申请日 2003.7.30 [21] 申请号 03125202.8

[71] 专利权人 中国科学院武汉病毒研究所
地址 430071 湖北省武汉市武昌小洪山

[72] 发明人 石正丽 袁军法
审查员 徐 莉

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所
代理人 王敏锋

权利要求书 2 页 说明书 11 页

[54] 发明名称

复合多聚酶链 - 酶联免疫反应检测对虾病毒的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种复合多聚酶链 - 酶联免疫反应检测对虾病毒的方法。其步骤：首先是捕获探针和扩增引物的设计与合成；其次是组织总核酸提取；三是复合多聚酶链反应标记地高辛；四是固相杂交；五是酶联显色。本发明具有高度的特异性和灵敏性，操作简单，可批量检测样品，适合于对虾白斑综合征病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒的诊断以及亲虾、幼苗和成虾的健康状态监测。

1、一种复合多聚酶链-酶联免疫反应检测对虾病毒的方法，包括下列步骤：

(1) 特异性寡核苷酸探针和扩增引物的设计和筛选：根据病毒基因组序列设计，对虾白斑综合征病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒末端标记生物素的捕获探针序列为：生物素- ACTGTCACTGTTGCT ；生物素- AGTTAGAACGGATAG ；生物素- AGCAAGGTAGAGCTG ，扩增白斑综合征病毒的上下游引物序列为： $\text{TGATTTGTTGTGCCCTTTTG}$ ， $\text{ACGTAGGGTTCGATGTTGGTG}$ ；扩增肝胰腺细小病毒的上下游序列为： $\text{ACACAGCAATATGATCAAGAGAAA}$ ， $\text{GCACTGGCCATCGTATCTT}$ ；扩增桃拉综合症病毒的上下游引物序列为： $\text{TCGCTGCATGAGAAGGGTTAT}$ ， $\text{TTTTTCGATGCAGATGGGTAAC}$ ；

(2) 组织总核酸提取：取感染白斑综合征病毒、肝胰腺细小病毒和桃拉综合症病毒的对虾组织，匀浆后加裂解液和蛋白酶 K， 55°C 温浴 1h，间隔 10min 摇动一次，冰浴 3—5min 后以 12000g 离心 10min，取上清加预冷的异丙醇， -20°C 放置 30min 后以 12000g 离心 15min，70% 乙醇洗涤沉淀，干燥后以焦碳酸四乙酯处理的双蒸水重悬沉淀；

(3) 复合多聚酶链反应标记地高辛：取对虾组织总核酸，加入桃拉综合症病毒下游引物 $\text{TTTTTCGATGCAGATGGGTAAC}$ ， 70°C 温浴 5min，冰浴 5min 后依次加入反转录缓冲液、dNTP、RNA 酶抑制剂和反转录酶，补充焦碳酸四乙酯处理的双蒸水至总体积为 $25\mu\text{l}$ ， 42°C 温浴 1h 进行反转录反应；对虾病毒核酸在扩增过程中标记上地高辛，整个标记扩增体系在 $50\mu\text{l}$ 反应体系内进行，含有反转录产物作模板、一倍的多聚酶链反应缓冲液、一倍的地高辛标记 dNTP 混合物、步骤(1)所述的扩增引物混合物和 Taq 酶，反应循环为 94°C 30S、 53°C 30S， 72°C 1min，共进行 30 个循环，最后 72°C 延伸 10min；

(4) 寡核苷酸探针的固相化：固相杂交反应用包被好链亲和素的 96 孔微孔反应板，步骤(1)所述的三种病毒捕获探针分别以含牛血清白蛋白的磷酸缓冲液稀释后包被 96 孔微孔反应板， $22-25^{\circ}\text{C}$ 温浴 30—60min，以含牛血清白蛋白的磷酸缓冲液浸泡洗板， 4°C 保存备用；

(5) 固相杂交：取扩增产物热变性 10min，冰浴 3—5min，加至结合有步骤(1)所述的三种病毒捕获探针的微孔反应板中，并加杂交缓冲液，混匀后于 25℃温浴 1—2h，用含吐温-20 的磷酸缓冲液洗板；

(6) 酶联显色：杂交后，以牛血清白蛋白的磷酸缓冲液稀释偶联有碱性磷酸酶的抗地高辛抗体，加至各反应孔中，37℃温浴 30—60min 后以含吐温-20 的磷酸缓冲液洗板，以对硝基苯磷酸酯作为底物，以 Tris 盐酸缓冲液稀释，避光显色 30-60min，以氢氧化钠终止反应；

(7) 结果判定：肉眼观察，显色黄色为阳性。

复合多聚酶链-酶联免疫反应检测对虾病毒的方法

技术领域

本发明属于虾类病害检测技术领域,更具体涉及一种复合多聚酶链-酶联免疫反应检测对虾病毒的方法,适用于对虾白斑综合征病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒病原的诊断。

背景技术

对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)是90年代初引起东南亚对虾养殖暴发性死亡的主要病毒病原,能感染绝大多数对虾品种,致死率高达90-100%。主要症状为对虾体色发红,皮下、甲壳及附肢出现白色斑点。还能感染淡水和海水其它甲壳动物(张建红等1994; Takahashi *et al.*, 1994; Lo *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1995; Corbel *et al.*, 2001)。桃拉综合症病毒(Taura Syndrome Virus, TSV)于1992年首先在南美白对虾(*Penaeus vannamei*)体内发现,目前为我国南美白对虾养殖的主要病害。桃拉综合症病毒感染对虾仔虾、稚虾和幼虾,引起的累积死亡率在40-90%。发病对虾尾部和附肢发红、甲壳软化、表皮角质层出现黑色斑点等特征,病理症状表现为病虾鳃、附肢、体表、后肠胃等部位表皮角质层、皮下组织坏死,细胞核固缩化(Hasson *et al.*, 1999)。对虾肝胰腺细小病毒(Hepatopancreatic parvovirus, HPV)最早在中国发现,但其传播范围很广,近年来,在亚洲、非洲、澳大利亚、南美洲和北美洲都有相关的报道。该病毒侵染的靶组织是对虾肝胰腺和中肠后段上皮细胞,被病毒感染的对虾生长变缓,并导致一定的累计死亡率(Bonami *et al.*, 1995, 肖连春等, 1995)。这三种病原均被列为需向OIE申报的疾病。从目前的文献和专利查询结果知道,只有单一病毒或两种病毒复合多聚酶链反应检测技术的报道(Durand *et al.*, 1996, Hasson *et al.*, 1997, Lightner, 1996, Lightner *et al.*, 1993, Nadala Jr. & Loh, 2000, Tsai *et al.*, 2002),没有关于对虾白

斑综合征病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒复合检测技术的有关报道。

参考文献:

- 1 肖连春 石正丽 高玮 等 (1995). 中国对虾一种球状病毒的分离提纯及核酸蛋白特性的研究. *中国病毒学*, 10 (4): 356-361.
- 2 张建红 陈棣华 肖连春 等 (1994). 中国对虾非包涵体杆状病毒在体内的感染与发生. *中国病毒学*, 9 (4): 362-365.
- 3 Bonami, J. R., Mari, J., Poulos, B. T. & Lightner, D. V. (1995). Characterization of hepatopancreatic parvo-like virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps. *J Gen Virol* 76, 813-7.
- 4 Corbel, V., Zuprizal, Shi, Z., Huang, C., Arcier, J. M. & Bonami, J. R. (2001). Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *J Fish Diseases* 24, 377-382.
- 5 Durand, S., Lightner, D. V., Nunan, L. M., Redman, R. M., Mari, J. & Bonami, J. R. (1996). Application of gene probes as diagnostic tools for White Spot Baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Dis Aquat Organ* 27, 59-66.
- 6 Hasson, K. W., Lightner, D. V., Mohny, L. L., Redman, R. M., Poulos, B. T. & Brenda, W. M. (1999). Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis Aquat Org* 36, 81-93.
- 7 Hasson, K. W., Hasson, J., Aubert, H., Redman, R. M. & Lightner, D. V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. *J Virol Methods* 66, 227-36.
- 8 Lightner, D. V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. In *Special publication of the World Aquaculture Society*. Baton Rouge, LA.
- 9 Lightner, D. V., Redman, R. M., Moore, D. W. & Park, M. A. (1993).

- Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. *Aquaculture* 116, 15-23.
- 10 Lo, C. F., Ho, C. H., Peng, S. E., Chen, C. H., Hsu, H. C., Chiu, Y. L., Chang, C. F., Liu, K. F., Su, M. S., Wang, C. H. & Kou, G. H. (1996). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis Aquat Organ* 27, 215-225.
- 11 Nadala Jr., E. C. B. & Loh, P. C. (2000). Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp. *Journal of Virological Methods* 84, 175-179.
- 12 Takahashi, Y., Itami, T., Kondo, M., Maeda M, Fujii, R., Tomonaga, S., Supamattaya, K. & Boonyaratpalin, S. (1994). Electron microscopy evidence of bacilliform virus infection in Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathology* 29, 121-125.
- 13 Tsai, J. M., Shiau, L. J., Lee, H. H., Chan, P. W. & Lin, C. Y. (2002). Simultaneous detection of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis Aquat Organ* 50, 9-12.
- 14 Wang, C. H., Lo, C. F., Leu, J. H., Chou, C. M., Yeh, P. Y., Chou, H. Y., Tung, M. C., Chang, C. F., Su, M. S. & Kou, G. H. (1995). Purification and genomic analysis of baculovirus associated with White Spot Syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Organ* 23, 239-242

文献 1, 3 和 10 报道了肝胰腺细小病毒的特性及其原位杂交检测技术。文献 2, 4, 5, 11, 12 和 14 报道了白斑综合征病毒的基本特性及其原位杂交、多聚酶链反应和酶联免疫反应检测技术。文献 6, 7, 报道的是桃拉综合症病毒的基本特性及其检测技术。文献 8 报道了包括肝胰腺细小病毒、白斑综合征病毒、桃拉综合症病毒等在内的几种主要对虾病毒的检测方法。文献 13 报道了桃拉综合症病毒与白斑综合征病毒两种病毒复合多聚酶链反应检测技术。

发明内容

本发明的目的在于提供了一种复合多聚酶链-酶联免疫反应检测对虾病毒的方法。以提取组织的总核酸粗制品为模板，通过生物素-链亲和素桥固定在 96 微孔板上的寡核苷酸作捕获探针，与经多聚酶链反应后标记的地高辛检测探针杂交，结合抗地高辛抗体和酶联免疫反应来达到检测病毒核酸的目的，该方法操作简便，灵敏度高，适合于对虾病毒病原的诊断以及亲虾、幼苗和成虾的健康状况监测。

为了达到以上目的，本发明采取以下技术方案：

(1) 特异性寡核苷酸捕获探针和扩增引物的设计筛选。

根据对虾白斑综合征病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒的全基因组序列，设计筛选病毒特异性的寡核苷酸探针和病毒核酸扩增引物（见序列表）。对虾白斑综合征病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒末端标记生物素的捕获探针长度为 15 碱基对，序列分别与对虾白斑综合征病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒的正链互补，定位于检测探针的中间。检测白斑综合征病毒、肝胰腺细小病毒、桃拉综合症病毒的扩增产物探针长度分别为 331 碱基对、194 碱基对和 236 碱基对。所有引物根据对虾白斑综合征病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒特有基因组序列设计，由专业生物公司合成。

(2) 逆转录体系

以提取组织总核酸为模板，取 2 μg 的总核酸粗制品，加入 1 μg 的桃拉综合症病毒下游引物：TTTTCGATGCAGATGGGTAAC，70 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5min，立即冰浴 5min 后依次加入 5 μl 的反转录缓冲液、5 μl dNTP (10mM)、25 单位 RNA 酶抑制剂和 200 单位反转录酶，补充焦碳酸四乙酯处理的双蒸水至总体积为 25 μl ，42 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1h。

(3) 复合多聚酶链反应标记反应体系的建立。

白斑综合征病毒、肝胰腺细小病毒的 DNA 和经反转录的桃拉综合症病毒核酸在扩增过程中标记上地高辛。整个标记扩增体系在 50 μl 反应体系内进行，含有 2 μl 的反转录产物作模板，一倍的多聚酶链反应缓冲液，一倍的地高辛标记 dNTP 混合物，按 1: 2: 2 的比例混合对虾白斑综合征病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒特异性的扩增引物（30pmol 的白斑综合征病毒上下游扩增引物：

TGATTTGTTGTGCCCTTTTG, ACGTAGGGTCGATGTTGGTG、60pmol 的肝胰腺细小病毒上下游扩增引物：ACACAGCAATATGATCAAGAGAAA, GCACTGGCCATCGTATCTT 和 60pmol 的桃拉综合症病毒上下游扩增引物：TCGCTGCATGAGAAGGGTTAT, TTTTCGATGCAGATGGGTAAC), 2 单位的 Taq 酶。反应循环为 94°C 30s、53°C 30s, 72°C 1min, 共进行 30 个循环。最后 72°C 延伸 10min。

(4) 杂交检测体系的建立。

杂交体系选择的缓冲液为 5x SSC, 5x Denhardt, 0.1%月桂酰肌氨酸钠, 0.02%十二烷基硫酸钠。根据寡核苷酸探针和杂交链的特性筛选 25°C 作为杂交温度。酶联免疫反应检测体系选择磷酸缓冲液。

本发明与现有技术相比有以下优点：在同一体系内能同时检测对虾白斑综合征病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒；工艺简便，操作方便，灵敏度高，能检测出少于 0.01pg 的病毒核酸。适合多种病毒的病原诊断以及亲虾、幼苗和成虾的健康状况监测。

具体实施方式

具体步骤如下：

(1) 特异性寡核苷酸探针和扩增引物的设计和筛选：根据病毒基因组序列设计，对虾白斑综合征病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒末端标记生物素的捕获探针序列为：生物素 -ACTGTCACTGTTGCT；生物素 -AGTTAGAACGGATAG；生物素 -AGCAAGGTAGAGCTG，扩增白斑综合征病毒的上下游引物序列为：TGATTTGTTGTGCCCTTTTG, ACGTAGGGTCGATGTTGGTG；扩增肝胰腺细小病毒的上下游序列为：ACACAGCAATATGATCAAGAGAAA, GCACTGGCCATCGTATCTT；扩增桃拉综合症病毒的上下游引物序列为：TCGCTGCATGAGAAGGGTTAT, TTTTCGATGCAGATGGGTAAC。检测白斑综合征病毒、肝胰腺细小病毒、桃拉综合症病毒的扩增产物探针长度分别为 331 碱基对、194 碱基对和 236 碱基对(序列列表)。所有引物由专业生物技术公司合成。

(2) 组织总核酸提取：总核酸提取方法：取感染白斑综合征病毒，肝胰腺

细小病毒和桃拉综合症病毒的组织（鳃和肝胰腺）15—20mg，幼苗则取去眼球的个体，匀浆后加裂解液 600 μ l（100mM 氯化钠，10mM 乙二胺四乙酸，50mM Tris 碱，0.5%十二烷基硫酸钠）和 15 μ l 蛋白酶 K（20mg/ μ l），55 $^{\circ}$ C 温浴 1h，间隔 10min 摇动一次，冰浴 3—5min 后以 12000g 离心 10min，取上清加 0.5-1 倍体积预冷的异丙醇，-20 $^{\circ}$ C 放置 30min 后以 12000g 离心 15min，70%乙醇洗涤沉淀，干燥后以焦碳酸四乙酯处理的双蒸水重悬沉淀。所得即为含有对虾白斑综合症病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒核酸（DNA 和 RNA）的粗制品。

（3）复合多聚酶链反应标记地高辛：取对虾病毒的总核酸粗制品，加入 1 μ l 的桃拉综合症病毒下游引物 TTTTCGATGCAGATGGGTAAC，70 $^{\circ}$ C 温浴 5min，立即冰浴 5min 后依次加入 5 μ l 的反转录缓冲液、5 μ l dNTP(10mM、25 单位 RNA 酶抑制剂和 200 单位反转录酶，补充焦碳酸四乙酯处理的双蒸水至总体积为 25 μ l，42 $^{\circ}$ C 温浴 1h，产物可以不作任何处理直接用作多聚酶链反应扩增的模板。白斑综合症病毒、肝胰腺细小病毒的 DNA 和经反转录的桃拉综合症病毒即为对虾病毒核酸在扩增过程中标记上地高辛。整个标记扩增体系在 50 μ l 反应体系内进行，含有 2 μ l 的反转录产物作模板，一倍的多聚酶链反应缓冲液，一倍的地高辛标记 dNTP 混合物，对虾白斑综合症病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒特异性的扩增引物混合物（30pmol 的白斑综合症病毒上下游扩增引物（TGATTTGTTGTGCCCTTTTG，ACGTAGGGTCGATGTTGGTG），60pmol 的肝胰腺细小病毒上下游扩增引物（ACACAGCAATATGATCAAGAGAAA，GCACTGGCCATCGTATCTT）和 60pmol 的桃拉综合症病毒上下游扩增引物（TCGCTGCATGAGAAGGGTTAT，TTTTCGATGCAGATGGGTAAC），2 单位的 Taq 酶。反应循环为 94 $^{\circ}$ C 30S、53 $^{\circ}$ C 30S，72 $^{\circ}$ C 1min，共进行 30 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

（4）寡核苷酸探针的固相化：固相杂交反应用包被好链亲和素的 96 孔微孔反应板，末端标记上生物素的捕获探针经生物素—链亲和素桥锚定在微孔板上。将对对虾白斑综合症病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒核酸的捕获探针以含 0.1%牛血清白蛋白的磷酸缓冲液(pH7.4)稀释(终浓度为 10pmol/ml)，以 100 μ l 每孔加到反应孔中，22—25 $^{\circ}$ C 温浴 30—60min，以含 0.1%牛血清白蛋白的磷酸缓冲液(pH7.4)250 μ l 浸泡洗板 5 次，每次维持 1min。包被好捕获探针的 96 孔微

孔反应板在 4℃ 保存备用。

(5) 固相杂交：取扩增产物 10 μ l 热变性 10min，立即冰浴 3—5min，加至结合有特异性寡核苷酸捕获探针的微孔反应板中，并加杂交缓冲液（5x SSC, 5x Denhardt, 0.1% 月桂酰肌氨酸钠，0.02% 十二烷基硫酸钠）至 100 μ l，充分混匀后于 25℃ 温浴 1—2h。用含 0.1% 吐温-20 的磷酸缓冲液 250 μ l 洗板 5 次，每次 1min，以无纤维的吸水纸吸干。

(6) 酶联显色：杂交后，以含 0.1% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液 (pH7.4) 稀释 (1: 5000) 耦连有碱性磷酸酶的抗地高辛抗体，100 μ l 加至各反应孔中。37℃ 温浴 30—60min 后以含 0.1% 吐温-20 的磷酸缓冲液 250 μ l 洗板 5 次，每次 1min。以对硝基苯磷酸酯 (p-nitrophenyl phosphate, p-NPP) 作为底物，以 Tris 盐酸缓冲液 (pH9.6) 稀释至 1mg/ml，100 μ l 加至各反应孔中，避光显色 30-60min，以 40 μ l 氢氧化钠 (2M) 终止反应。以肉眼观察作定性判断或以酶标仪读取 405 nm 吸光度 ($A_{405\text{ nm}}$ 值) 作半定量判断。

(7) 结果判定：肉眼观察，显色黄色为阳性；或以标本/阴性对照比值这种判断法作为阳性判断标准，在得出标本 (S) 和阴性对照 (N) 的 $A_{405\text{ nm}}$ 值后，计算 S/N 值，大于 1.0 作为阳性。

序 列 表

<110>中国科学院武汉病毒研究所

<120>复合多聚酶链-酶联免疫反应检测对虾病毒的方法

<160>12

<170>PatentIn 3.1

<210>1

<211>331

<212>DNA

<213> 白斑综合征病毒(White spot syndrome virus)

<400>1

tgatttggtg tgcccttttg caaggcatag gattgtacat ttcttataaa aaataaaaca	60
atatataaaa ttcagttgta tttttattgc tcaaataagt tactacaccc aattctcccc	120
cctctctagt gagagatccc aatcactttc tactgtcact gttgctgctg tttgttgttc	180
ctctttctcc tctctttctt cctcttccate ttcatcttct ttagttcgtt cttcattata	240
tgctttaatt atcctcaata cattttaaatt ggtgcgctct tctcggttaa acttctgatt	300
ctttccctca ccaccaacat cgaccctacg t	331

<210>2

<211>236

<212>DNA

<213> 桃拉综合症病毒(Taura syndrome virus)

<400>1

tcgctgcatg agaaggggta tttcttaatg ttctgcgatg tcattaagat agcgtgtagg	60
aacgcagggt acaaggaagc atgtttacat gagttgatt gtaagagctt ctttttgccc	120
cagcaaggta gagctggagc tcatgatagt gagttcctaa gtcagctatt ggacttaaac	180
taatagcacc acccgatcgt aaactccatg tattggttac ccatctgcat cgaaaa	236

<210>3

<211>194	
<212>DNA	
<213> 肝胰腺细小病毒 (Hepatopancreatic parvovirus)	
<400>1	
acacagcaat atgatcaaga gaaaactcca gcagtcaaaa gagctctaga actaactcaa	60
gaagaagaac agttagaacg gatagaaaac gctaagaaat atattgagga agttatagag	120
gagacaaaca gagaatttga aagtgaagta agacaagaga caagtgcgga ggcggaagat	180
acgatggcca gtgc	194
<210>4	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 白斑综合征病毒(White spot syndrome virus)	
<400>1	
tgatttggtg tgcccttttg	20
<210>5	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 白斑综合征病毒(White spot syndrome virus)	
<400>1	
acgtagggtc gatgttggtg	20
<210>6	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 桃拉综合症病毒(Taura syndrome virus)	
<400>1	
tcgctgcatg agaagggtta t	21

<210>7	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 桃拉综合症病毒(Taura syndrome virus)	
<400>1	
ttttc gatgc agatgggtaa c	21
<210>8	
<211>24	
<212>DNA	
<213> 肝胰腺细小病毒(Hepatopancreatic parvovirus)	
<400>1	
acacagcaat atgatcaaga gaaa	24
<210>9	
<211>19	
<212>DNA	
<213> 肝胰腺细小病毒(Hepatopancreatic parvovirus)	
<400>1	
gcactggcca tcgtatctt	19
<210>10	
<211>15	
<212>DNA	
<213> 白斑综合征病毒(White spot syndrome virus)	
<400>1	
actgtcactg ttgct	15

<210>11

<211>15

<212>DNA

<213> 桃拉综合症病毒(Taura syndrome virus)

<400>1

agcaaggtag agctg

15

<210>12

<211>15

<212>DNA

<213> 肝胰腺细小病毒(Hepatopancreatic parvovirus)

<400>1

agttagaacg gatag

15

专利名称(译)	复合多聚酶链 - 酶联免疫反应检测对虾病毒的方法		
公开(公告)号	CN1243981C	公开(公告)日	2006-03-01
申请号	CN03125202.8	申请日	2003-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院武汉病毒研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院武汉病毒研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院武汉病毒研究所		
[标]发明人	石正丽 袁军法		
发明人	石正丽 袁军法		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/569 G01N33/68 C12Q1/68		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN1484029A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种复合多聚酶链-酶联免疫反应检测对虾病毒的方法。其步骤：首先是捕获探针和扩增引物的设计与合成；其次是组织总核酸提取；三是复合多聚酶链反应标记地高辛；四是固相杂交；五是酶联显色。本发明具有高度的特异性和灵敏性，操作简单，可批量检测样品，适合于对虾白斑综合征病毒、桃拉综合症病毒和肝胰腺细小病毒的诊断以及亲虾、幼苗和成虾的健康状态监测。