

## 十足目虹彩病毒 1 (DIV1) 荧光 PCR 检测试剂盒说明书

### 1、试剂盒简介

货号：HB-814-1

十足目虹彩病毒 1 感染 (Infection with decapod iridescent virus 1, IDIV1) 是一种能够导致甲壳动物高死亡率的新发疫病。该病的病原为十足目虹彩病毒 1 (DIV1)，目前包含两个病毒株，即：虾血细胞虹彩病毒 (Shrimp hemocyte iridescent virus, SHIV) 和红螯螯虾虹彩病毒 (Cherax quadricarinatus iridovirus, CQIV)，这两株病毒的基因组相似性为 99%。为了适应十足目虹彩病毒 1 (DIV1) 快速检测需要，本公司按照权威文献推荐的基因序列，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、安全、操作简单、应用广泛等特点及优点。

### 2、试剂盒组成

试剂盒组成包括核酸提取试剂和核酸扩增试剂，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
核酸扩增试剂： DEPC 水	5ml × 1 管
DIV1 荧光 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
DIV1 阳性对照	1ml × 1 管

\*保存条件：试剂盒须在-20℃保存。

### 3、样本采集，存放及运输

#### 3.1 样本采集

采集活的或濒死的甲壳动物的组织研磨，PBS 稀释后提取核酸。

#### 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、检测步骤

#### 4.1 DNA 核酸提取操作方法(在样本处理区进行)：

4.1.1 取 n 个 1.5ml 灭菌 Eppendorf 管，其中 n 为待检样品数、一管阳性对照和一管阴性对照之和，对每个管进行编号标记。(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，用前需吹打混匀)

4.1.2 每管加入 100 μl DNA 提取液 1，然后分别加入待测样本、阴性对照和阳性对照(阳性对照吸取前充分混匀)各 100μl，一份样本换用一个吸头；混匀器上震荡混匀 5 s，于 4℃~25℃ 条件下，12 000 r/min 离心 10 min。

4.1.3 尽可能吸弃上清且不碰沉淀，再加入 10μl DNA 提取液 2，混匀器上震荡混匀 5s，于 4℃~25℃ 条件下，2 000 r/min 离心 10 s。

公司地址：北京市顺义区南法信顺畅大道 14 号院东亚首航国际 1 号楼 3 层 329 室

公司网址：www.halcyonbio.com

邮 箱：haisentong@126.com

电话：010-50933811, 13718421576, 17718526815

客服 QQ：737481857 835171324

4.1.4 100℃ 干浴或沸水浴 10 min; 加入 90μl DEPC 水, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 即为提取的 DNA, 冰上保存待用 (提取的 DNA 需在 2 h 内进行 PCR 扩增或放置于-70℃冰箱内保存)。

## 4.2 荧光 PCR 检测

4.2.1 扩增试剂准备 (在反应混合物配制区进行):

从试剂盒中取出荧光 PCR 反应液、Taq 酶, 2000×g 离心 5 秒钟。每个样品测试反应体系配制见下表 2。

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	荧光 PCR 反应液	Taq 酶	合计
用量	14.5 μL	0.5 μL	15 μL

4.2.2 加样 (样本处理区进行):

向每个 PCR 管中各分装 15 μL 的混合液, 再分别加入样本 DNA 模板 10 μL, 盖紧管盖, 500 r/min 离心 30 s。(注: 阳性对照不需要提取核酸, 可以直接吹打混匀后吸取当模板)

4.2.3 荧光 PCR 检测 (在检测区进行):

循环条件设置:

第一阶段, 94℃ /3 min;

第二阶段, 94℃/15 s, 60℃/30 s; 40个循环; 在每次循环的60℃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。

## 5、结果判定

### 5.1 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。

### 5.2 质控标准

5.2.1 阴性对照无Ct值或无扩增曲线。

5.2.2 阳性对照的Ct值应<28.0, 并出现典型的扩增曲线。否则, 此次实验视为无效。

### 5.3 结果描述及判定

5.3.1 阴性

无Ct值或无扩增曲线, 示样品中无十足目虹彩病毒1核酸。

5.3.2 阳性

Ct值≤30, 且出现典型的扩增曲线, 示样品中存在十足目虹彩病毒1核酸。

5.4 有效原则

Ct>30的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性, 否则为阳性。