

传染性造血器官坏死病毒 (IHNV) 荧光 RT-PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号: HB-702-1

传染性造血器官坏死病,是由有囊膜子弹状的传染性造血器官坏死病毒(IHNV)感染绝大多数大麻哈鱼属和鲑科鱼类所产生的一种病毒性疾病。易感动物主要为虹鳟、硬头鳟、银鳟、大鳞大麻哈鱼、红大麻哈鱼和大西洋鲑等。其中虹鳟对该病毒极为敏感,2月龄幼鱼最易感染,且病程急,发病后死亡率高达50%-100%。本病全年均可发生,以早春到初夏多见,水温8-12℃时为流行高峰。

为了适应传染性造血器官坏死病毒(IHNV)快速检测和疫病研究的需要,本公司参考OIE水生动物疾病诊断手册2.3.4中规定的引物序列,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、安全操作简单、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
IHNV 荧光 RT-PCR 反应液	750μL × 1 管
酶混合物	60μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
IHNV 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。

取新鲜鱼类组织脏器(肝、脑、脾、肾)2g 于已洗净、灭菌并烘干的研钵中充分研磨,加5ml PBS 混匀,2000r/min 离心10min 取上清转入无菌离心管中备用。或取有可疑细胞病变的细胞悬液用于检测。

3.2 存放: 研磨后的样本在2℃—8℃条件下保存应不超过24h; -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、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、阳性对照与阴性对照的和（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吹打混匀后直接作为 PCR 检测的模板，无需提取核酸）
- 4.1.1.2 每管加入 600 μL 裂解液，分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 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 μL ，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 μL 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 μL 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 μL	1.0 μL

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 μL ，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 μL ，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。（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）

4.1.2.3 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，反转录 42 $^{\circ}\text{C}$ /30 min；

第二阶段，预变性 92 $^{\circ}\text{C}$ /3 min；

第三阶段，92 $^{\circ}\text{C}$ /15s，60 $^{\circ}\text{C}$ /30s，40 个循环，在第三阶段每次循环的 60 $^{\circ}\text{C}$ 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。

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 <28.0 ，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 IHNV 核酸。

4.2.3.2 阳性

Ct 值 ≤ 30 ，且出现典型的扩增曲线，示样品中存在 IHNV 核酸。

4.2.3.3 有效原则

Ct 值 >30 的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性，否则为阳性。

5、相关技术信息（引物和探针序列）

IHNV 荧光探针：5` FAM-ACC GGC CTC CTC TTC ACC TG TAMRA-3`

IHNV 荧光上游：5`-GAT CGT AAA GGA AAA TGT CCT-3`

IHNV 荧光下游：5`-GCT TGT TTT GGC AGT ATG T-3`