

马鼻肺炎（马疱疹病毒 1 型）EHV-1 荧光 PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for equid herpesvirus-1 (EHV-1)

(50 reactions)

1、试剂盒简介

货号：HB-513

马鼻肺炎 (Equine rhinopneumonitis) 是由马疱疹病毒 1 型和 4 型 (equid herpesvirus-1/4, EHV-1/4) 感染引起马属动物高度接触传染性疾病的总称，其主要临床特征为呼吸道感染、新生马驹感染、妊娠母马流产和神经系统症状。本试剂盒是依据 OIE 诊断手册马鼻肺炎 3.6.9 相关标准中推荐的荧光 PCR 引物和探针配制，探针的 5' 端和 3' 端分别标记不同的荧光素，5' 端标记 FAM 荧光素，3' 端为 BHQ1 修饰。

2、试剂盒组成

试剂盒具体组成参见表 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	1ml × 1 管
EHV-1 荧光 PCR 反应液	750μL × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
EHV-1 荧光阳性对照	1ml × 1 管

(注：样品推荐使用提取核酸更快捷方便的《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》)

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。

用于检测多种样本中病原的 DNA。

3.2 存放：样品应尽快提取核酸进行检测，-70 °C 以下可长期保存，但应避免反复冻融。

3.3 运输：采用冰壶或泡沫箱加冰密封进行运输。

4、荧光 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）：详见具体使用的病毒细菌核酸提取试剂盒说明书。

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 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
用量	15 μ L	0.5 μ L

4.1.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个荧光 PCR 管孔中各分装 15 μ L 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 10 μ L，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 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：

第一阶段，95 $^{\circ}$ C/2 min；

第二阶段，95 $^{\circ}$ C/15 sec，60 $^{\circ}$ C/1 min，40个循环，在第二阶段每次循环的60 $^{\circ}$ 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 结果分析条件的设定 阈值设定原则：根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过阴性对照品扩增曲线的最高点为准。对于多通道荧光 PCR 仪，选定 FAM(465-510)检测通道读取检测结果，ABI 仪器选择 5' FAM；3' BHQ1 淬灭基团。

4.2.2 质控标准

- 阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线。
- 阳性对照的 Ct 值应小于等于 30，并出现典型的扩增曲线。
- 如阴性和阳性对照不满足以上条件，此次实验视为无效。

4.2.3 结果判定

- 阴性：无特异性扩增曲线或 Ct 值 > 45，表明样品为马疱疹病毒 1 型核酸阴性。
- 阳性：Ct 值 < 40.0，且出现典型的扩增曲线，表示样品为阳性，含有马疱疹病毒 1 型核酸。
- 临界值有效判定原则：40.0 < Ct 值 \leq 45.0 的样本应重做，重做结果无 Ct 值且无明显扩增曲线则为阴性，而有 Ct 值且有明显扩增曲线则为阳性。

【注意事项】

- 实验室应至少分三个区：样品处理区、反应混合物配制区和检测区。
- 各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染。检测结束后，应立即对工作台进行清洁。
- 分装反应液时，应尽量避免产生气泡。上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
- 阳性对照在吸取前应在微量漩涡振荡器上剧烈振荡 1~2 秒。
- 试剂盒中各组分应避免反复冻融。

【规格】 50 份/盒

【贮藏与有效期】 荧光 PCR 检测试剂盒-20 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 12 个月。