

## 鲤春病毒血症病毒 (SVCV) 一步法 RT-PCR 检测试剂盒说明书

### 1、试剂盒简介

货号：HB-701-2

鲤春病毒血症 (SVC)，又名鲤春病毒病，是一种由弹状病毒引起的主要感染四大家鱼和几种鲤科鱼的病毒性传染病。主要危害鲤，但也可感染草鱼、鲢、鳙、鲫和六须鲃等。鲤是其中最敏感的宿主，又以 1 龄以上的鲤危害最为严重。该病主要流行于春季，水温在 13-20℃ 时流行。本病的主要病症是鱼群聚集于出水口处，体色发黑，呼吸缓慢，病鱼往往失去平衡而侧游，有瘀斑性出血，皮肤及鳃上最多见。

为了适应鲤春病毒血症病毒 (SVCV) 快速检测和疫病研究的需要，本公司参考 2015 版 OIE 水生动物疫病诊断手册 2.3.8 规定的 SVC 的 RT-PCR 检测病毒的引物序列及其循环参数和中华人民共和国出入境检验检疫行业标准《鲤春病毒血症检测技术规范》(SN/T 1152-2011) 中规定的技术标准，在本公司严谨的产品质量保证体系管控下生产和质检，确保本试剂盒满足 SVC 的检测标准要求。本试剂盒具有快速灵敏、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
SVCV RT-PCR 反应液	750 μL × 1 管
酶混合物	60 μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
SVCV 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，2 000r/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 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、一步法 RT-PCR 检测

#### 4.1 操作方法

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 电话：010-50933955, 13718421576, 18610566381  
 邮 箱：haisentong@126.com 客服 QQ：737481857 1632557907  
 淘宝店铺：https://shop484557060.taobao.com/ 微 信：Halcyonbio



#### 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。
- 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℃ 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℃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℃、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℃、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℃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℃冰箱内。**

#### 4.2、试剂准备

##### 4.2.1 扩增试剂准备（在反应混合物配制区进行）：

从试剂盒中取出相应的一步法RT-PCR反应液、RT-PCR混合酶，在室温下融化后，2 000 r/min离心5 s。设所需一步法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下表2。

表2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	RT-PCR 反应液	RT-PCR 混合酶
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，向每个一步法RT-PCR管中各分装15 μL，转移至样本处理区。

##### 4.2.2 加样（在样本处理区进行）：

在各设定的一步法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30s。

#### 4.3、检测（在检测区进行）：

将4.2.2中离心后的PCR管放入PCR检测仪内，记录样本摆放顺序。循环条件设置如下：

第一阶段：42℃/30 min；

第二阶段：95℃/2 min；

第三阶段：94℃/1 min，55℃/1 min，72℃/1min，40个循环；

第四阶段，72℃/10 min；

第五阶段，4℃ 保存。



#### 4.4、琼脂糖电泳

用电泳缓冲液制备1.5%的琼脂糖凝胶平板。将平板放入水平电泳槽，使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将样品PCR扩增产物和相应电泳上样缓冲液（Loading Buffer）按比例混匀后加入样品孔。在电泳时设立DNA标准分子量作对照。5 V/cm电泳约0.5 h，当溴酚蓝到达底部时停止。在紫外灯下或凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增初预期的特异性DNA电泳带，拍摄并记录。

#### 5、结果判定

5.1 SVCV一步法RT-PCR后阳性对照出现一条714 bp的DNA片段。阴性对照和空白对照没有该核酸带。

5.2 待测样品在相应 714 bp DNA 位置上有带，可判阳性。无带的样品需要通过嵌套反应进行进一步确认。

#### 6、相关技术信息

引物序列

SVCV F: 5' -TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR\*-R\*TC-3'

SVCV R: 5' -AGA-TGG-TAT-GGA-CCC-CAA-TAC-ATH\*-ACN\*-CAY\*-3'

