

流行性造血器官坏死病毒（EHNV）PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-707-2

流行性造血器官坏死病，是由无囊膜胞浆型虹彩病毒科蛙病毒属的流行性造血器官坏死病毒（EHNV）所引起的鱼类疾病。病鱼因肝脏、脾脏、肾脏造血组织和其他组织坏死而导致死亡。易感动物主要为赤鲈、虹鳟等种类，其中，赤鲈对该病毒极为敏感，幼鱼和成鱼都可受 EHNV 感染。为了适应流行性造血器官坏死病毒（EHNV）快速检测和监测的需要，本公司参照 2015 年 OIE 水生动物疾病诊断手册 2.3.1 中推荐的引物序列，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）

组成成分	体积
样品 DNA 提取液 1	5ml×1 管
样品 DNA 提取液 2	500μl×1 管
核酸扩增试剂： DEPC 水	5ml×1 管
EHNV PCR 反应液	750μl×1 管
Taq 酶(5U/ul)	40μl×1 管
阴性对照	1ml×1 管
EHNV 阳性对照	1ml×1 管

***保存条件：样品 DNA 提取液 1、2 和试剂盒须在-20℃保存。**

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、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，

公司地址：	联系电话: 400-895-2698;	公司主页：
北京市海淀区香山路中国林业科学研究	010-62824033	www.halcyonbio.com
院林木遗传育种国家重点实验室 B 座	传 真：010-62824033	在线 QQ 客服：
邮政编码：100091	邮 箱：haisentong@126.com	737481857
		1632557907

对每个管进行编号标记。

- 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。
- 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 PCR 检测

4.2.1 扩增试剂准备（在反应混合物配制区进行）：

从试剂盒中取出相应的 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	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 管孔中各分装 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。

4.2.3 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：

第一阶段，94℃/2min；

第二阶段，95℃/1 min，55℃/1 min，72℃/1 min，35 个循环；

第三阶段，72℃延伸 10min，4 ℃保温。

4.3 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，使电泳缓冲液刚好没过胶面，向 PCR 扩增产物中加入 1/6 体积的电泳上样缓冲液（6X 上样缓冲液），按比例混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA DL2000 Marker 做对照。5 V/cm 电泳约 0.5 h，当溴酚蓝到达一定位置时停止。在紫外灯下或凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 电泳带，拍摄并记录。

5、结果判定

- 5.1 PCR 后，阳性对照会出现一条 580 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 PCR 扩增后能在相应 580 bp DNA 位置上有带，可判为 EHN 核酸阳性。

6、相关技术信息

引物序列：

F: 5' -CGC-AGT-CAA-GGC-CTT-GAT-GT-3'

R: 5' -AAA-GAC-CCG-TTT-TGC-AGC-AAA-C-3'

公司地址：

北京市海淀区香山中路中国林业科学研究
院林木遗传育种国家重点实验室 B 座

邮政编码：100091

联系电话: 400-895-2698;

010-62824033

传 真：010-62824033

邮 箱：haisentong@126.com

公司主页：

www.halcyonbio.com

在线 QQ 客服：

737481857

1632557907