

传染性皮下和造血组织坏死病毒 (IHHNV) PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-802-2

传染性皮下和造血器官坏死病毒 (IHHNV) 是细小病毒科简短病毒属的一个暂定种，也称为南美蓝对虾浓核病毒 (*PstDNV*)。流行于世界各地的养殖对虾，引起南美蓝对虾 90% 的死亡率；但南美白对虾和斑节对虾则只引起生长缓慢和表皮畸形，不造成死亡。IHHNV 主要感染表皮、前肠和后肠的上皮、性腺、淋巴器官和结缔组织的细胞，很少感染肝胰腺。为了适应 IHHNV 的快速检测和疫病研究的需要，本公司参照 2015 年 OIE 发布的水生动物疾病诊断手册 2.2.2 章中推荐的 PCR 引物序列和检测方法，同时也满足 GB/T25878-2010 对虾传染性皮下和造血组织坏死病毒 (IHHNV) 检测 PCR 法的要求。经多次实验及系统优化，开发生产了本试剂盒。应用本试剂盒进行核酸提取和 PCR 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
IHHNV PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
IHHNV 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：仔虾和稚虾，取整只虾或虾头做样品，取虾头时，去除眼睛、头胸甲、所有的胸部附器和头部以后的腹部。成虾取附肢或血淋巴作为样品。具体采样要求见 SN/T1673-2005 等相关标准要求。

3.2 存放：采集活的或濒死的虾组织作为样品，死亡 2 小时以后的虾不可采用。处理前要将样品放在冰上，如果 2 小时以后处理，应将样品保存在 95% 的乙醇中，乙醇体积是样品体积的 10 倍以上，放置在室温可存放 1 个月。

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)：

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 3 单元 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

- 4.1.1 取 n 个 1.5ml 灭菌 Eppendorf 管，其中 n 为待检样品数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）
- 4.1.2 每管加入 100 μ l DNA 提取液 1，然后分别加入待测样本和阴性对照各 100 μ l，一份样本换用一个吸头；混匀器上震荡混匀 5 s，于 4 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 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 10 μ l DNA 提取液 2，混匀器上震荡混匀 5s，于 4 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 条件下，2 000 r/min 离心 10 s。
- 4.1.4 100 $^{\circ}$ C 干浴或沸水浴 10 min；加入 90 μ l 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 $^{\circ}$ C 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 \times 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 μ L	0.5 μ L	15 μ L

4.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个 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，使用前直接吹打混匀后吸取当模板）

4.2.3 PCR 检测（在检测区进行）：

第一阶段，95 $^{\circ}$ C/5 min；

第二阶段，95 $^{\circ}$ C/30sec，55 $^{\circ}$ C/30sec；72 $^{\circ}$ C/1 min；35个循环；

第三阶段，72 $^{\circ}$ C/7 min；

第四阶段，4 $^{\circ}$ C 保存

4.3 琼脂糖电泳

用电泳缓冲液制备 1.5%的琼脂糖凝胶平板并加入核酸染料。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 0.5h，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 389 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 389 bp DNA 位置上有带，可判为 IHNV 核酸阳性。

6、相关技术信息

389F: 5' -CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3'

389R: 5' -GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'