

蛙病毒属通用荧光 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-1001-1

为了适应虹彩病毒科蛙病毒属（除新加坡石斑鱼虹彩病毒之外）病毒的快速检测需要，本公司针对蛙病毒属的流行性造血器官坏死病毒（epizootic haematopoietic necrosis virus, EHNV）、斑点叉尾鮰虹彩病毒（cat fish iridovirus）、黑真鮰蛙病毒（ictalurus melas ranavirus）和虹鳟蛙病毒（oncorhynchus mykiss virus）、欧鲇病毒（european sheat fish virus, ESV）、欧洲鲶鱼病毒（european catfish virus）、蛙虹彩病毒（bohle iridovirus, BIV）、虎纹蛙病毒（tiger frog virus, TFV）等病毒的主衣壳蛋白（MCP）基因序列，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）

试剂盒组成成分	体积
核酸提取试剂： 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
蛙病毒属荧光 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
蛙病毒属阳性对照	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

采集活的或濒死的两栖类动物的肾或脾等组织研磨，PBS 稀释后提取核酸。或将细胞培养分离病毒的有 CPE 的细胞悬液提取核酸病毒。

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，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，用前需吹打混匀）

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

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

邮 箱：haisentong@126.com

电话：010-50933811, 13718421576, 17718526815

客服 QQ：737481857 835171324

取前充分混匀)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 荧光 PCR 检测

4.2.1 扩增试剂准备(在反应混合物配制区进行):

从试剂盒中取出荧光 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	荧光 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。(注: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)

4.2.3 荧光 PCR 检测(在检测区进行):

循环条件设置:

第一阶段,94 $^{\circ}$ C /3 min;

第二阶段,94 $^{\circ}$ C/15 s,55 $^{\circ}$ C/15 s,60 $^{\circ}$ C/30 s;40 个循环;在每次循环的 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。

5、结果判定

5.1 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。

5.2 质控标准

5.2.1 阴性对照无 Ct 值或无扩增曲线。

5.2.2 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。

5.3 结果描述及判定

5.3.1 阴性

无 Ct 值或无扩增曲线,示样品中无蛙病毒核酸。

5.3.2 阳性

Ct 值 \leq 30,且出现典型的扩增曲线,示样品中存在蛙病毒核酸。

5.4 有效原则

Ct >30 的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性,否则为阳性。

6、相关技术信息

MCP-153F: 5'-TCACCAAGCTGCCGTCTCT-3'

MCP-215R: 5'-AAAAGTCTGCCCCGAAAGC-3'

MCP-175T: (FAM)5'-CGCCAAGATGTTCGGGCAACCC-3'(BHQ1)

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

邮 箱:haisentong@126.com

电话:010-50933811,13718421576,17718526815

客服 QQ:737481857 835171324