

流行性造血器官坏死病毒 (EHNV) 荧光 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-707-1

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。EHNV 属于虹彩病毒科蛙病毒属 (除新加坡石斑鱼虹彩病毒之外) 病毒，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) 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
EHNV 荧光 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
EHNV 荧光阳性对照	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

采集活的或濒死的鱼的肾或脾等组织，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 /4 min;

第二阶段, 95 $^{\circ}$ C/15 s, 60 $^{\circ}$ C/60 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EHNv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EHNv核酸。为进一步确诊是EHNv, 建议用普通PCR进行确认或测序。

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'-CGCCAAGATGTCGGGCAACCC-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