

传染性皮下和造血器官坏死病毒 (IHHNV) 荧光 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-802-1

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 (*Ps tDNV*)。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 2019 年 OIE 发布的水生动物疾病诊断手册 2.2.4 章中推荐的荧光 PCR 引物和探针序列和检测方法。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)

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
IHHNV 荧光 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
IHHNV 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

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。

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、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。

4.2.3 荧光 PCR 检测 (在检测区进行):

循环条件设置:

第一阶段, 95 $^{\circ}$ C/10 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

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





无Ct值或无扩增曲线，示样品中无IHHNV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IHHNV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

F: 5'-TACTCC-GGA-CAC-CCA-ACC-A-3'

R: 5'-GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA-3'

probe : 5'FAM-ACC-AGA-CAT-AGA-GCT-ACA-ATC-CTC-GCC-TAT-TTG-3'TAMRA

