

鲑鱼传染性贫血病毒 (ISAV) 荧光 RT-PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of Infectious Salmon Anaemia (ISAV)

(50 reactions)

1、试剂盒简介

货号: HB-705-1

鲑鱼传染性贫血症, 英文名: Infectious Salmon Anaemia, 简称 ISA。它的主要症状是严重贫血, 受感染后的鲑鱼大约在 2-3 周后死亡。不同的鲑鱼对 ISA 病毒有不同的敏感性, 主要体征表现为鱼眼球突出, 腹腔积水, 腹部器官出血, 有时也会发生在皮肤上。肝脏或肾脏局部组织死亡。症状的特征是贫血、腹水、脾肿大和在眼、皮肤和腹膜出血。实验已经证明, 虹鳟, 褐鳟鱼和鲑鱼可能是 ISA 病毒无症状携带者。

为了适应鲑鱼传染性贫血症病毒 (ISAV) 快速检测和疫病研究的需要, 本公司参考 2015 年 OIE 水生动物疾病诊断手册 2.3.5 中规定的引物和探针序列, 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、应用广泛和高通量检测等特点及优点。

2、试剂盒组成

试剂盒组成包括核酸扩增试剂。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: 核酸裂解液	15ml × 2 管
核酸扩增试剂: DEPC 水	1ml × 1 管
ISAV 荧光 RT-PCR 反应液	750μL × 1 管
酶混合物	60μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
ISAV 荧光阳性对照	1ml × 1 管

(注: 核酸提取试剂可使用本公司生产的提取核酸更快捷方便的《病毒 RNA 柱式提取试剂盒》)

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。或取有可疑细胞病变的细胞悬液用于检测。

3.2 存放: 研磨后的样本在 2 °C—8 °C 条件下保存应不超过 24 h; -70 °C 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、荧光 RT-PCR 检测

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

4.1 操作方法

4.1.1 样本的处理（在样本制备区进行）：

4.1.1.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，其中 n 为被检样品与阴性对照的和（阳性对照、阴性对照在试剂盒中已标出），做标记。

（注：试剂盒中的阳性对照直接作为一步法RT-PCR检测的模板，无需提取核酸）

4.1.1.2 每管加入 600 μ L 裂解液，分别加入被检样本和阴性对照各 200 μ L，一份样本换用一个吸头，再加入 200 μ L 氯仿，混匀器上振荡混匀 5 s（不能过于强烈，以免产生乳化层，也可以用手颠倒混匀），于 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min。

4.1.1.3 取与 4.1.1.1 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，加入 500 μ L 异丙醇（-20 $^{\circ}$ C 预冷），做标记。吸取 4.1.1.2 各管中的上清液转移至相应的管中，上清液应至少吸取 500 μ L，不能吸出中间层，颠倒混匀。

4.1.1.4 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清，倒置于吸水纸上，沾干液体（不同样品须在吸水纸不同地方沾干）；加入 600 μ L 75% 乙醇，颠倒洗涤。

4.1.1.5 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清，倒置于吸水纸上，尽量沾干液体（不同样品须在吸水纸不同地方沾干）。

4.1.1.6 4 000 r/min 离心 10s（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），将管壁上的残余液体甩到管底部，小心倒去上清，用微量加样器将其吸干，一份样本换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面，室温干燥 3 min，不能过于干燥，以免 RNA 不溶。

4.1.1.7 加入 11 μ L DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2 000 r/min 离心 5 s，冰上保存备用。提取的 RNA 须在 2 h 内进行 PCR 扩增；若需长期保存须放置 -70 $^{\circ}$ C 冰箱内。

【也可参照《病毒 RNA 柱式提取试剂盒说明书》（货号：HB-QPCR-01）使用，更方便快捷提取核酸】。

注：提取的 RNA 须在 2 h 内进行 PCR 扩增；若需长期保存须放置 -70 $^{\circ}$ C 冰箱内。

4.1.2 检测

4.1.2.1 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荧光 RT-PCR 反应液、酶混合物，在室温下融化后，2000 r/min 离心 5 s。设所需荧光 RT-PCR 检测总数为 n，其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和，每个样品测试反应体系配制见表 2：

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	RT-PCR 反应液	酶混合物
用量	15 μ L	1.0 μ L

根据测试样品的数量计算好各试剂的使用量，加入到适当体积试管中，充分混合均匀，向每个荧光 RT-PCR 管中各分装 16 μ L，转移至样本处理区。

4.1.2.2 加样（样本处理区进行）：

在各设定的荧光 RT-PCR 管中分别加入上述样本处理步骤 4.1.1.7 中制备的 RNA 溶液各 10 μ L，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。

4.1.2.3 荧光 RT-PCR 检测（在检测区进行）：

将 4.1.2.2 中离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

循环条件设置：

第一阶段，反转录 42 $^{\circ}$ C /30 min；

第二阶段，预变性 92 $^{\circ}$ C /3 min；

第三阶段，92 °C/10s，60 °C/30s，72 °C/20s，40个循环，在第三阶段每次循环的60 °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。

4.2 结果判定

4.2.1 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。

4.2.2 质控标准

4.2.2.1 阴性对照无 Ct 值或无扩增曲线。

4.2.2.2 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。

4.2.3 结果描述及判定

4.2.3.1 阴性

无Ct值或无扩增曲线，示样品中无ISAV核酸。

4.2.3.2 阳性

Ct值 ≤ 30 ，且出现典型的扩增曲线，示样品中存在ISAV核酸。

4.2.3.3 有效原则

Ct值 >30 的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性，否则为阳性。

5、相关技术信息（引物和探针序列）

5' -CTA-CAC-AGC-AGG-ATG-CAG-ATG-T-3'

5' -CAG-GAT-GCC-GGA-AGT-CGA-T-3'

5' -6FAM-CAT-CGT-CGC-TGC-AGT-TC-MGBNFQ-3'