

金鱼造血器官坏死病毒 (GFHNV) 荧光 PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of GFHNV/CyHV-2

(50 reactions)

1、试剂盒简介

货号：HB-712-1

金鱼造血器官坏死病毒(GFHNV/CyHV-2)俗称鲤疱疹病毒2型。1992年秋季和1993年春季在日本西部养殖的金鱼暴发疱疹病毒性造血器官坏死病，造成的死亡率几乎达到了100%，这是有关该病的首次报道。在此之后美国、台湾、澳大利亚、英国和新西兰相继有该疾病暴发的报道。2011年国内某些异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)养殖的主要产区出现该疾病的暴发，发病鱼体表充血腹部肿胀，眼眶基部充血，鳃丝严重出血并发白，肌肉出血，脾肾有程度不一的出血，肝脾肿大，鳃出现点状出血。GFHNV的宿主范围包括金鱼和鲫鱼的普通变种，最适感染温度20-25℃；GFHNV对异育银鲫不同鱼龄均有致病力，但幼鱼比成鱼更易感，且死亡高峰期提前。本公司参照农业部2017年水生动物监测计划推荐的引物序列，开发生产了满足国内GFHNV监测标准的本试剂盒。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
GFHNV 荧光 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
GFHNV 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

所用取样器材必须经高压灭菌并烘干。取组织标记后置于离心管中，按照试剂盒配套的DNA 抽提试剂操作说明提取DNA模板。

3.2 存放

研磨后的样本在2℃—8℃条件下保存应不超过24h；-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。

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、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。

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 /2 min;

第二阶段, 95 $^{\circ}$ C/30 s, 58 $^{\circ}$ C/45 s, 72 $^{\circ}$ C/45 s; 40个循环; 在每次循环的72 $^{\circ}$ 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

邮 箱: haisentong@126.com

电话: 010-50933811, 13718421576, 17718526815

客服 QQ: 737481857 835171324

Ct值>40或无扩增曲线，示样品中无GFHNV核酸。

5.3.2 阳性

待测样品Ct值 \leq 35且出现典型扩增曲线，可判定为荧光PCR阳性；若待测样品无扩增曲线，或Ct值 $>$ 40，可判定为荧光PCR阴性。

对于 $35 < \text{Ct值} < 40$ 的样品，应进行重复检测。若重复检测的Ct值 \leq 35且出现典型扩增曲线，可判定为荧光PCR阳性；否则判为荧光PCR阴性。

5.4 有效原则

阴性对照和空白对照应无Ct值，阳性对照Ct值 $<$ 35，且出现S型典型扩增曲线，否则此次实验视为无效，应重新实验。

6、相关技术信息

荧光PCR用引物和探针

正向引物：5'-TCGGTTGGACTCGGTTTGTG-3'

反向引物：5'-CTCGGTCTTGATGCGTTTCTTG-3'

探针：5'-FAM-CCGCTTCCAGTCTGGGCCACTACC-BHQ1-3'

扩增CyHV2 DNA聚合酶基因中170bp的片段。