

草鱼出血病 (GCRV) GCRV873 株一步法 RT-PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of Hemorrhagic disease of grass carp (GCRV)

(50 reactions)

1、试剂盒简介

货号: HB-710-1

草鱼出血病 (Hemorrhagic disease of grass carp) 主要感染当年草鱼种和青鱼, 死亡率可达 80% 以上。其它淡水鲤科鱼, 如鲢鱼、鳙鱼、鲫鱼、鲤鱼感染后没有临床症状, 但可以携带病毒到处传播。该病在水温高于 20°C 以上时流行, 25~28°C 为流行高峰。常见的临床症状为眼突出、体色发黑, 口腔、鳃盖和鳍条基部出血。撕开表皮, 可见肌肉出现点状或块状出血。剖检腹腔, 可见肠道充血, 肝、脾充血或因失血而发白。病原为草鱼呼肠孤病毒 (Grass carp reovirus, GCRV), 是水生呼肠孤病毒属 (Aquareovirus) 的成员。病毒为直径 70nm 的球形颗粒, 有双层衣壳, 无囊膜, 含有 11 个片段的双链 RNA。根据片段长度大小分为大 (L1、L2、L3, 大小在 4.0kb~3.7kb)、中 (M4、M5、M6, 大小在 2.5~2.0kb)、小 (S7、S8、S9、S10、S11, 大小在 1.6~1.0kb) 三组。在不同地区存在抗原性、核酸电泳图谱、对细胞的敏感性和对鱼的毒力都有一定差异的毒株。多年研究已经确定的有二个典型的代表株: GCRV-873 为湖南株, 能在 CO、CIK 等细胞中大量增殖并出现 CPE, 症状以内脏出血为主; GCRV-9014 为湖北株, 能在 CIK、CO 细胞中大量增殖, 但不产生 CPE, 症状以肌肉出血为主。在核酸序列上 GCRV-9014 株和 GV-873 株的同源性不到 81%。

为了适应草鱼出血病 (GCRV) 快速检测和疫病研究的需要, 本公司严格依据 SN/T3584-2013 草鱼出血病检疫技术规范规定的检测 GCRV-873 株病毒的引物序列及其循环参数等技术标准, 在本公司严谨的产品质量保证体系管控下生产和质检。确保本试剂盒满足标准的检测要求。本试剂盒具有快速灵敏、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
GCRV-873 RT-PCR 反应液	750μL × 1 管
酶混合物	60μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
GCRV-873 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

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

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、一步法 RT-PCR 检测

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 PCR 检测的模板，无需提取核酸）

4.1.1.2 每管加入 600 μL 裂解液，分别加入被检样本和阴性对照 200 μL，一份样本换用一个吸头，再加入 200 μL 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 °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 μL 异丙醇（-20 °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 μL，不能吸出中间层，颠倒混匀。

4.1.1.4 于 4 °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 μL 75% 乙醇，颠倒洗涤。

4.1.1.5 于 4 °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 μL 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 °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 °C 冰箱内。

4.2、试剂准备

4.2.1 扩增试剂准备（在反应混合物配制区进行）：

从试剂盒中取出相应的一步法 RT-PCR 反应液、RT-PCR 混合酶，在室温下融化后，2 000 r/min 离心 5 s。设所需一步法 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下表 2。

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	RT-PCR 反应液	RT-PCR 混合酶
用量	15 μL	1.0 μL

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，向每个一步法 RT-PCR 管中各分装 15 μL，转移至样本处理区。

4.2.2 加样（在样本处理区进行）：

在各设定的一步法 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 μL，盖紧管盖，500 r/min 离心 30s。

4.3、检测（在检测区进行）：

将4.2.2中离心后的PCR管放入PCR检测仪内，记录样本摆放顺序。循环条件设置如下：

第一阶段：42 °C/30 min；

第二阶段：94 °C/4 min；

第三阶段：94 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/1 min, 30个循环；

第四阶段，72 °C/8 min；

第五阶段，4 °C 保存。

4.4、琼脂糖电泳

用电泳缓冲液制备1.5%的琼脂糖凝胶平板。将平板放入水平电泳槽，使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将10 μL样品PCR扩增产物和相应电泳上样缓冲液（Loading Buffer）按比例混匀后加入样品孔。在电泳时设立DNA标准分子量作对照。5 V/cm电泳约0.5 h，当溴酚蓝到达底部时停止。在紫外灯下或凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增初预期的特异性DNA电泳带，拍摄并记录。

5、结果判定

5.1 一步法RT-PCR后阳性对照出现一条697bp的DNA片段。阴性对照和空白对照没有该核酸带。

5.2 待测样品在相应 697 bp DNA 位置上有带，可判阳性。

6、相关技术信息

F: 5' -cgcgt tcgct gatgt aagg- 3'

R: 5' -ccccg atcat cacca cgat- 3'