

罗湖病毒 (TiLV) 嵌套 PCR 检测试剂盒说明书 (250bp)

1、试剂盒简介

货号：HB-717-2

罗湖病毒 (Tilapia lake virus, TiLV)，是一种由正粘病毒引起的主要感染罗非鱼的新发 RNA 病毒，目前在以色列、埃及、厄瓜多尔、哥伦比亚、泰国和我国都有发病报道。该病毒会导致养殖罗非鱼死亡率高达 90%，感染罗湖病毒的罗非鱼会出现以下症状：鱼体表面发红，眼睛、大脑和其他内脏发炎，最终导致器官衰竭而死。

为了适应罗湖病毒快速检测和疫病研究的需要，本公司参考 NACA 的权威文献推荐的普通 PCR 和嵌套 PCR 引物序列及其循环参数，在本公司严谨的产品质量保证体系管控下生产和质检，确保本试剂盒满足罗湖病毒的检测标准要求。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)

组成成分	体积
核酸扩增试剂： DEPC 水	1ml × 1 管
TiLV (250bp) PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
TiLV (250bp) 阳性对照	1ml × 1 管

3、嵌套 PCR 检测

3.1 样本的处理 (在样本制备区进行)：

如果 PCR 后产物电泳时看不到 DNA 带，取 2.5 μL 产物做模板；如果 PCR 后产物电泳时能看到 DNA 带，只是要求进一步核实，则需将产物按 1：100 稀释后，取 2.5 μL 产物做模板。

3.2 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嵌套 PCR 反应液、Taq 酶，在室温下融化后，2000 r/min 离心 5 s。设所需嵌套 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	PCR 反应液	Taq 酶	合计
用量	14.5 μL	0.5 μL	15 μL

3.3 加样 (样本处理区进行)：

在各设定的 PCR 管中分别加入上述样本处理步骤 3.1 中制备的 DNA 溶液各 2.5 μL，补加 DEPC 水 7.5 μL，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。

3.4 PCR 检测 (在检测区进行)：

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

循环条件设置:

第一阶段, 94°C/5 min;

第二阶段, 94°C/30sec, 55°C/30sec, 72°C/40sec, 30 个循环;

第三阶段, 72°C延伸 10min, 4 °C保温.

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, 使电泳缓冲液刚好没过胶面, 向 PCR 扩增产物中加入 1/6 体积的电泳上样缓冲液 (6X 上样缓冲液), 按比例混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA DL2000 Marker 做对照。5 V/cm 电泳约 0.5h, 当溴酚蓝到达一定位置时停止。在紫外灯下或凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 电泳带, 拍摄并记录。

5、结果判定

5.1 嵌套 PCR 后, 阳性对照会出现一条 250 bp 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 PCR 扩增后能在相应 250 bp DNA 位置上有带, 可判为 TiLV 核酸阳性。

6、相关技术信息

TiLV nexted ME2: TATCAGTGCGTACTCGTTCAGT

TiLV 下游引物 ME1: GTTGGGCACAAGGCATCCTA