

鲤浮肿病毒荧光 PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of Carp edema virus (CEV)

(50 头份/reactions)

1、试剂盒简介（货号：HB-718-1）

鲤浮肿病毒（Carp edema virus, CEV）是常见鱼类疫病病原，隶属痘病毒科，可以感染鲤和锦鲤，引起的临床症状包括烂鳃、眼球凹陷、食欲不振、体表出血等，死亡率高达 80%~100%，严重影响鲤和锦鲤养殖产业发展。1974 年日本新潟县首次报道发现该病毒后，现已报道发现过该病毒的国家有：美国、捷克、澳大利亚、英国、法国、德国、意大利、波兰、瑞士、印度、巴西、韩国先后报道。我国在 2016 年首次报道发现 CEV。

为适应鲤浮肿病毒（CEV）快速检测和常规监测任务的需要，经多次试验及系统优化，开发生产了本试剂盒。应用本试剂盒进行检测具有快速、特异、灵敏等特点，可用于鲤浮肿病毒快速检测。

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 |
|----------------|-------------|
| 核酸扩增试剂： | |
| DEPC 水 | 1ml × 1 管 |
| CEV 荧光 PCR 反应液 | 875μL × 1 管 |
| 阴性对照 | 1ml × 1 管 |
| 荧光阳性对照 | 1ml × 1 管 |

（注：推荐使用提取核酸更快捷方便的《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》）

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。

用于检测鲤和锦鲤等病毒感染组织样本中鲤浮肿病毒和锦鲤疱疹病毒的 DNA。

3.2 存放：样品应尽快研磨提取核酸进行检测，-70 °C 以下可长期保存，但应避免反复冻融。

3.3 运输：采用冰壶或泡沫箱加冰密封进行运输。

4、荧光 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）：详见核酸提取试剂盒说明书。【推荐使用《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》》，更方便快捷高效提取核酸】。

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 PCR 反应液，2000×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 |
|----|--------------|
| 用量 | 17.5 μ L |

4.1.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个荧光 PCR 管孔中各分装 17.5 μ L 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 2.5 μ L，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。荧光阳性对照吹打混匀后吸取直接用于扩增。

4.1.2.3 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/5 sec，56 $^{\circ}$ C/31 sec，40 个循环，在第二阶段每次循环的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 质控标准

- 阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线。
- 阳性对照的 Ct 值应小于等于 35，并出现典型的扩增曲线。
- 如阴性和阳性对照不满足以上条件，此次实验视为无效。

4.2.2 结果判定

- 阴性：无 Ct 值，且无特征性扩增曲线，表明样品为阴性。
- 阳性：Ct 值 \leq 35，且出现典型的扩增曲线表示样品为阳性，含有鲤浮肿病毒核酸。
- Ct 值大于 35，且出现典型的扩增曲线的样品建议复验。复验仍出现上述结果的，判为阳性，否则判为阴性。

5、相关技术信息（引物和探针序列）

CEV-R: 5' -GATTCCTCAAGGAGTTDCAGTAAA-3'

CEV-F: 5' -AGTTTTGTAKATTGTAGCATTTC-3'

CEV-Probe: 5' - FAM-AGAGTTTGTCTTGCCATACAACT-BHQ1-3'

【注意事项】

- 实验室应至少分三个区：样品处理区、反应混合物配制区和检测区。
- 各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染。检测结束后，应立即对工作台进行清洁。
- 分装反应液时，应尽量避免产生气泡。上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
- 阳性对照在吸取前应在微量漩涡振荡器上剧烈振荡 1~2 秒。
- 试剂盒中各组分应避免反复冻融。

【规格】 50 份/盒

【贮藏与有效期】 荧光 PCR 检测试剂盒-20 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 12 个月；《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》室温保存。