

水貂阿留申病毒和细小病毒双重荧光 PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of
aleutian disease of mink(ADV) and Mink enteritis virus MEV
(50 reactions)

1、试剂盒简介

货号：HB-408

水貂阿留申病 (aleutian disease of mink) 是由阿留申病毒感染水貂引起的以终生毒血症、全身淋巴细胞增殖、血清 r-球蛋白数增多、肾小球肾炎、动脉血管炎和肝炎为特征的慢性病毒病。水貂阿留申病在世界各养貂国家均有发生，所有品系的水貂均能感染，具有阿留申基因型的水貂甚至有 1/3 死于该病，水貂阿留申病能使母貂空怀率和仔貂死亡率显著增高，公貂的交配能力下降，还能影响发育而使毛皮品质低下，造成经济损失，是世界公认的养貂的三大疫病之一。阿留申病毒 (ADV) 属细小病毒科 (Parvoviridae)，细小病毒属 (Parvovirus)。ADV 抵抗力极强，耐热、耐酸、耐乙醚。典型 AD 水貂的组织、唾液、粪便、尿、血清及全血中的病毒均有感染性。水貂感染 ADV 后 10 天，即可在肝、脾和淋巴结中查出，且能持续较长时间。水貂阿留申病通过水平和垂直的方式进行传播。病毒由粪便、尿、唾液排出，通过粪便-口腔途径和唾液-气雾-呼吸道途径传播，公貂的精液可以带毒，患病公貂可通过交配，引起母貂的生殖道感染，然后又由母貂通过垂直传播将病毒传递给胎儿。本试剂盒可检测出水貂阿留申病毒，探针的 5' 端和 3' 端分别标记不同的荧光素，如 5' 端标记 FAM 荧光素，3' 端为 BHQ1 修饰。

水貂病毒性肠炎 (Mink parvoviral enteritis)，是由水貂肠炎细小病毒 (Mink enteritis virus MEV) 引起的高度接触性传染病，发病水貂的主要临床特征为剧烈腹泻和呕吐等，该病具有较高的发病率和死亡率。随着毛皮动物养殖业的迅速发展，此病也时常爆发，给水貂养殖业造成巨大的经济损失。本试剂盒探针的 5' 端和 3' 端分别标记不同的荧光素，如 5' 端标记 CY5 荧光素，3' 端为 BHQ2 修饰。

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
ADV&MEV 荧光 PCR 反应液	750 μL × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40 μL × 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。

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

电 话：13718421576

邮 箱：haisentong@126.com

客服 QQ：737481857

用于检测多种样本（如患病动物的分泌物如鼻咽拭子或组织病料中）中水貂阿留申病毒和细小病毒的 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、Taq 酶，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	Taq 酶	合计
用量	19.5 μL	0.5 μL	20 μL

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 20 μL 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 5 μL，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。

4.1.2.3 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：

第一阶段，94°C/3 min；

第二阶段，94°C/15 sec，60 °C/30 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 结果分析条件的设定 阈值设定原则：根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过阴性对照品扩增曲线的最高点为准。对于多通道荧光 PCR 仪，选定 FAM 检测通道读取检测结果，ABI 仪器选择 5' FAM，3' MGB 淬灭基团或无荧光标记淬灭基团；选定 CY5 检测通道读取检测结果时，3' 端选择无荧光标记淬灭基团。

4.2.2 质控标准

- 阴性对照无 Ct/Cp 值并且无扩增曲线。
- 阳性对照的 Ct/Cp 值应小于等于 30，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。

4.2.3 结果判定

- 阴性：无 Ct/Cp 值，且无特征性扩增曲线，表明样品为阴性。
- 阳性：Ct/Cp 值 ≤ 30.0，且出现典型的扩增曲线表示样品为阳性，含有水貂阿留申病毒或细小病毒核酸。
- Ct/Cp 值大于 30.0，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。

【注意事项】

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：13718421576

客服 QQ：737481857



1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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 RT-PCR 检测试剂盒-20℃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。