

## 鲤春病毒血症病毒 (SVCV) 荧光 RT-PCR 检测试剂盒说明书

### 1、试剂盒简介

货号：HB-701-1

鲤春病毒血症 (SVC)，又名鲤春病毒病，是一种由弹状病毒引起的主要感染四大家鱼和几种鲤科鱼的病毒性传染病。主要危害鲤，但也可感染草鱼、鲢、鳙、鲫和六须鲃等。鲤是其中最敏感的宿主，又以 1 龄以上的鲤危害最为严重。该病主要流行于春季，水温在 13-20℃ 时流行。本病的主要病症是鱼群聚集于出水口处，体色发黑，呼吸缓慢，病鱼往往失去平衡而侧游，有瘀斑性出血，皮肤及鳃上最多见。

为了适应鲤春病 (SVC) 病毒快速检测和疫病研究的需要，本公司参照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准《鲤春病毒血症检疫技术规范》(SN/T 1152-2011) 中规定的引物和探针序列，经多次实验及系统优化，开发生产了本试剂盒。应用本试剂盒进行检测具有快速、灵敏、特异、准确、安全操作简单、应用广泛和高通量检测等特点及优点。

### 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
SVCV 荧光 RT-PCR 反应液	750μL × 1 管
酶混合物	60μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
SVCV 荧光阳性对照	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检测。

3.2 存放：研磨后的样本在 2℃—8℃ 条件下保存应不超过 24 h；-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。

### 4、荧光 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)：

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

- 4.1.1.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和（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吹打混匀后直接作为 PCR 检测的模板，无需提取核酸）
- 4.1.1.2 每管加入 600  $\mu\text{L}$  裂解液，分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各 200  $\mu\text{L}$ ，一份样本换用一个吸头，再加入 200  $\mu\text{L}$  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 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  异丙醇（-20 $^{\circ}\text{C}$  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 $\mu\text{L}$ ，不能吸出中间层，颠倒混匀。
- 4.1.1.4 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、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  $\mu\text{L}$  75% 乙醇，颠倒洗涤。
- 4.1.1.5 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、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 33  $\mu\text{L}$  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 $^{\circ}\text{C}$  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 $^{\circ}\text{C}$  冰箱内。

#### 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 RT-PCR 反应液、酶混合物，在室温下融化后，2000 r/min 离心 5 s。设所需荧光 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表 2：

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	RT-PCR 反应液	酶混合物
用量	15 $\mu\text{L}$	1.0 $\mu\text{L}$

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，向每个荧光 RT-PCR 管中各分装 15 $\mu\text{L}$ ，转移至样本处理区。

##### 4.1.2.2 加样（样本处理区进行）：

在各设定的荧光 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  $\mu\text{L}$ ，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。（阳性对照不需要提取核酸，可以直接吹打混匀后吸取当模板）

##### 4.1.2.3 荧光 RT-PCR 检测（在检测区进行）：

将 4.1.2.2 中离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

循环条件设置：

第一阶段，反转录 42 $^{\circ}\text{C}$  /30 min；

第二阶段，预变性 92 $^{\circ}\text{C}$ /3 min；

第三阶段，92 $^{\circ}\text{C}$ /15s，60 $^{\circ}\text{C}$ /30s，40 个循环，在第三阶段每次循环的 60 $^{\circ}\text{C}$  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。

## 4.2 结果判定

### 4.2.1 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。

### 4.2.2 质控标准

4.2.2.1 阴性对照无 Ct 值或无扩增曲线。

4.2.2.2 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。

### 4.2.3 结果描述及判定

#### 4.2.3.1 阴性

无 Ct 值或无扩增曲线，示样品中无 SVC 核酸。

#### 4.2.3.2 阳性

Ct 值 $\leq 30$ ，且出现典型的扩增曲线，示样品中存在 SVC 核酸。

#### 4.2.3.3 有效原则

Ct 值 $>30$ 的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性，否则为阳性。

## 5、相关技术信息（引物和探针序列）

SVC 荧光上游引物：5' - ATCATTCAAAGGATTGCATCAG -3'

SVC 荧光下游引物：5' - CATATGGCTCTAAATGAACAGAA-3'

SVC 荧光 probe : 5' -FAM- TCCCCCTCAAAGTTGCCGATGG-BHQ1-3'