

## 金鱼造血器官坏死病病毒 (GFHNV) PCR 检测试剂盒说明书 (366bp)

### 1、试剂盒简介

货号：HB-712-3

金鱼造血器官坏死病毒(GFHNV/CyHV-2) 俗称鲤疱疹病毒 2 型。1992 年秋季和 1993 年春季在日本西部养殖的金鱼暴发疱疹病毒性造血器官坏死病，造成的死亡率几乎达到了 100%，这是有关该病的首次报道。在此之后美国、台湾、澳大利亚、英国和新西兰相继有该疾病暴发的报道。2011 年国内某些异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 养殖的主要产区出现该疾病的暴发，发病鱼体表充血腹部肿胀，眼眶基部充血，鳃丝严重出血并发白，肌肉出血，脾肾有程度不一的出血，肝脾肿大，鳃出现点状出血。GFHNV 的宿主范围包括金鱼和鲫鱼的普通变种，最适感染温度 20-25℃；GFHNV 对异育银鲫不同鱼龄均有致病力，但幼鱼比成鱼更易感，且死亡高峰期提前。本公司参照农业部 2017 年水生动物监测计划推荐的引物序列，开发生产了满足国内 GFHNV 监测标准的本试剂盒。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
样品 DNA 提取液 1	5ml × 1 管
样品 DNA 提取液 2	500μl × 1 管
核酸扩增试剂： DEPC 水	5ml × 1 管
GFHNV (366 bp) PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
GFHNV (366 bp) 阳性对照	1ml × 1 管

**\*保存条件：样品 DNA 提取液 1、2 和试剂盒须在-20℃保存。**

### 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、检测步骤

#### 4.1 DNA 核酸提取操作方法(在样本处理区进行)：

4.1.1 取 n 个 1.5ml 灭菌 Eppendorf 管，其中 n 为待检样品数和一管阴性对照之和，对每个管进行

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 电话：010-50933955, 13718421576, 18610566381

邮 箱：haisentong@126.com 客服 QQ：737481857 1632557907

淘宝店铺：https://shop484557060.taobao.com/ 微 信：Halcyonbio



编号标记。(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)

- 4.1.2 每管加入 100  $\mu$ l DNA 提取液 1，然后分别加入待测样本和阴性对照各 100 $\mu$ l，一份样本换用一个吸头；混匀器上震荡混匀 5 s，于 4 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 条件下，12 000 r/min 离心 10 min。
- 4.1.3 尽可能吸弃上清且不碰沉淀，再加入 10 $\mu$ l DNA 提取液 2，混匀器上震荡混匀 5s，于 4 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 条件下，2 000 r/min 离心 10 s。
- 4.1.4 100 $^{\circ}$ C 干浴或沸水浴 10 min；加入 90 $\mu$ l DEPC 水，12 000 r/min 离心 10 min，吸取上清，即为提取的 DNA，冰上保存待用（提取的 DNA 需在 2 h 内进行 PCR 扩增或放置于-70 $^{\circ}$ C 冰箱内保存）。

## 4.2 检测

### 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 PCR 反应液、Taq 酶，2000 $\times$ 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	PCR 反应液	Taq 酶	合计
用量	14.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	15 $\mu$ L

### 4.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个 PCR 管孔中各分装 15  $\mu$ L 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 10  $\mu$ L，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。

### 4.2.3 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：

第一阶段，94 $^{\circ}$ C/5 min；

第二阶段，94 $^{\circ}$ C/1 min，60 $^{\circ}$ C/1 min，72 $^{\circ}$ C/1 min，35 个循环；

第三阶段，72 $^{\circ}$ C 延伸 10min，4  $^{\circ}$ C 保温。

## 4.3 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 PCR 后，阳性对照会出现一条 366bp 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 366 bp DNA 位置上有带，可判为 GFHNV 核酸阳性。需要综合判定 GFHNV 阳性时还需要根据标准要求继续测序或扩增另外一对引物来确认。

## 6、相关技术信息

### CyHV2 引物

CyHV2HeI-F: 5' - GGACTTGCGAAGAGTTTGATTTCTAC-3'

CyHV2HeI-R: 5' - CCATAGTCACCATCGTCTCATC-3'

扩增 CyHV2 解旋酶基因中 366bp 的片段。

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：010-50933955, 13718421576, 18610566381  
 邮箱：haisentong@126.com 客服 QQ: 737481857 1632557907  
 淘宝店铺：https://shop484557060.taobao.com/ 微信：Halcyonbio

