

水貂细小病毒荧光 PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of Mink enteritis virus MEV

(50 reactions)

1、试剂盒简介

货号：HB-403

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 |
| 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。

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 | 14.5 μ L | 0.5 μ L | 15 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 15 μ L 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 10 μ L，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 $^{\circ}$ C/3 min；

第二阶段，94 $^{\circ}$ C/15 sec，60 $^{\circ}$ 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 CY5 检测通道读取检测结果，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 \leq 30.0，且出现典型的扩增曲线表示样品为阳性，含有水貂细小病毒核酸。
- 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】

- 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 RT-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。