

传染性皮下和造血组织坏死病毒（IHHNV）核酸检测试剂盒（PCR 荧光探针法）使用说明书

（使用前请详细阅读本说明书）

【产品名称】

通用名称：传染性皮下和造血组织坏死病毒（IHHNV）核酸检测试剂盒（PCR 荧光探针法）

英文名称：PCR Detection Kit for Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (Fluorescent Probe Assay)

【包装规格】48 测试/盒

【产品编号】FZ002AF2

【产品简介】

本试剂盒适用于水产样本中传染性皮下和造血组织坏死病毒（IHHNV）的检测。

【检测原理】

基于实时荧光 PCR 技术，针对 IHHNV 特异性基因设计引物和荧光探针并优化反应所需试剂组分，加入待检样品核酸即可进行扩增反应。在扩增过程中，荧光探针与目的基因片段结合，可被 Taq 酶分解并产生荧光信号，此时荧光定量 PCR 仪可识别该荧光信号，同时根据其强弱变化绘制出相应的实时扩增曲线，进而判定 IHHNV 是否检出。

【产品组分】

组分名称	规格×数量
裂解液	1 mL×2 管
阳性对照	200 μL×1 管
阴性对照	200 μL×1 管
预混液	1 mL×1 管
说明书	1 份

【储存条件与保质期】

-20℃储存，有效期为 9 个月，避免反复冻融。

【灵敏度】

最低检验限：10-100 Copies/Test

【所需其他材料和适用仪器】

荧光定量 PCR 仪（具有能够检测 FAM 标记的荧光通道）、高速离心机、移液器、移液枪头及离心管等。

【使用指南】

1. 样品前处理

取 50 mg 左右（约黄豆粒大小）的组织样品（对虾鳃、胃及各期虾苗幼体）于玻璃匀浆器中匀浆，匀浆后置于 1.5 mL 离心管中。

2. DNA 提取

- 1) 对上述处理好的样品加入 50 μL 裂解液，100℃恒温处理 10 分钟，13000 rpm 离心 5 分钟，上清即含待检测样品 DNA。如不立刻开展检测请将上清液转移至 0.2 mL 无菌离心管中，-20℃保存。
- 2) DNA 的提取也可以采用商品化的水生动物病毒核酸提取试剂盒进行提取，请严格按照试剂盒说明书进行操作。

3. 加样、反应

- 1) 按照需求取 n 个 PCR 反应管（n=待检测样品数+1 管阴性对照+1 管阳性对照），从试剂盒中取出预混液，充分融化，涡旋振荡后短暂离心，向以上每个 PCR 管中加入 20 μL 预混液。
- 2) 向上述 n 个反应管中分别按顺序加入阴性对照、待测样品 DNA、阳性对照各 5 μL，加样后立刻盖紧管盖，短暂离心，立即进行 PCR 扩增反应。
- 3) PCR 反应体系为 25 μL，设置 FAM 检测通道读取，在反应阶段 2 中 60℃时收集荧光信号，具体程序如下：

反应阶段	温度	时间	信号收集	循环数
1	95℃	30 sec		1
2	95℃	5 sec	√	40
	60℃	30 sec		

注：对于 ABI 系列荧光定量 PCR 仪器，其反应体系中无需添加 ROX，且在软件设置时，在“Passive Reference”和“Quencher”处均选择“None”。

4. 结果

一般情况下，可通过软件自动设定的基线、阈值等直接读取检测结果。如需调整，可根据所使用仪器的自身情况（如噪声等）以及选取的不同荧光通道进行调整。

1) 质量控制:

阴性对照未出现明显的 S 型扩增曲线或 Ct 值 > 37, 阳性对照出现 S 型扩增曲线且其 Ct 值 < 30。若阴阳性对照未同时满足上述条件, 则本次检测结果无效, 应重新检测或与产品技术支持联系。

2) 结果判读:

- ① 无 Ct 值, 且未出现典型的 S 型扩增曲线, 为阴性结果, 判定为 IHHNV 未检出;
- ② Ct 值 ≤ 37, 且出现典型的 S 型扩增曲线, 为阳性结果, 判定为 IHHNV 检出;
- ③ Ct 值 > 37, 且出现典型的 S 型扩增曲线, 建议重新检测, 若重检后 Ct 值 ≤ 37, 且出现典型的 S 型扩增曲线, 则判定为阳性结果, 反之则为阴性结果。

【注意事项】

1. 实验环境条件和过程控制应参照 GB/T 27403《实验室质量控制规范食品分子生物学检测》规定执行。
2. 使用本试剂盒前请仔细阅读本说明书全文, 检测过程中建议穿洁净工作服, 戴一次性手套, 使用的移液枪头需提前灭菌。
3. 试剂盒中试剂使用前需充分融化、混匀,

短暂离心后使用, 期间需尽量避免产生气泡, 加样完毕后检查反应管是否盖紧, 避免泄露造成污染。

4. 待检测样品基因变异可能会造成假阴性结果; 待检测样品交叉污染、实验室环境污染以及试剂污染均会造成假阳性结果。
5. 不同批号的产品请勿混合使用, 请在产品有效期内使用试剂盒, 由于操作不当引起的误判, 以及由此误判引发的其他事项, 本公司概不负责。
6. 检测完毕后, 根据相关规定正确处理废弃耗材以及扩增产物。

【生产企业】

企业名称: 广东环凯生物科技有限公司
生产地址: 肇庆高新技术产业开发区科技大街中 13 号
邮政编码: 526238
技术热线: 020-32078333-8877
企业网址: <http://www.bhkbio.com>
E-mail: Webmaster@huankai.com

【说明书修改时间】

2020 年 9 月 22 日