

传染性鲑鱼贫血病毒（ISAV）一步法 RT-PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-705-2

为了适应传染性鲑鱼贫血病（ISA）快速检测和疫病研究的需要，本公司严格依据 2014 版 OIE 水生动物疫病诊断手册规定的 ISAV 的 RT-PCR 检测病毒的引物序列及其循环参数等技术标准，在本公司严谨的产品质量保证体系管控下生产和质检。确保本试剂盒满足 OIE 中 ISAV 的检测标准要求。本试剂盒具有快速灵敏、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
ISAV RT-PCR 反应液	750μL×1 管
酶混合物	60μL×1 管
阴性对照	1ml×1 管
ISAV 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、一步法 RT-PCR 检测

4.1 样本的处理（在样本制备区进行）：

4.1.1 取n个灭菌的1.5 mL Eppendorf管，其中n为被检样品与阴性对照的和（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直接作为一步法RT-PCR检测的模板，无需提取核酸）

公司地址：

北京市海淀区香山路中国林业科学研究
院林木遗传育种国家重点实验室 B 座

邮政编码：100091

联系电话：400-895-2698；

010-62824033

传 真：010-62824033

邮 箱：haisentong@126.com

公司主页：

www.halcyonbio.com

在线 QQ 客服：

737481857

1632557907

- 4.1.2 每管加入 600 μL 裂解液，分别加入被检样本和阴性对照各 200 μL ，一份样本换用一个吸头，再加入 200 μL 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。
- 4.1.3 取与 4.1.1.1 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，加入 500 μL 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 μL ，不能吸出中间层，颠倒混匀。
- 4.1.4 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 μL 75% 乙醇，颠倒洗涤。
- 4.1.5 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）。
- 4.1.6 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。
- 4.1.7 加入 11 μL 或 21 μL 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。

【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】。

4.2、试剂准备

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一步法 RT-PCR 反应液、RT-PCR 混合酶，在室温下融化后，2 000 r/min 离心 5 s。设所需一步法 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下表 2。

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	RT-PCR 反应液	RT-PCR 混合酶
用量	15 μL	1.0 μL

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，向每个一步法 RT-PCR 管中各分装 15 μL ，转移至样本处理区。

4.2.2 加样（在样本处理区进行）：

在各设定的一步法 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 μL ，盖紧管盖，500 r/min 离心 30s。

注：试剂盒中的阳性对照直接作为一步法 RT-PCR 检测的模板，无需提取核酸。

4.3、检测（在检测区进行）：

将 4.2.2 中离心后的 PCR 管放入 PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。循环条件设置如下：

第一阶段：42 $^{\circ}\text{C}$ /30 min；

第二阶段：95 $^{\circ}\text{C}$ /3 min；

第三阶段：95 $^{\circ}\text{C}$ /45 sec, 54 $^{\circ}\text{C}$ /1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ /1 min, 35 个循环；

第四阶段，72 $^{\circ}\text{C}$ /10 min；

第五阶段，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

公司地址：

北京市海淀区香山中路中国林业科学研究
院林木遗传育种国家重点实验室 B 座

邮政编码：100091

联系电话：400-895-2698；

010-62824033

传 真：010-62824033

邮 箱：haisentong@126.com

公司主页：

www.halcyonbio.com

在线 QQ 客服：

737481857

1632557907

4.4、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，使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将10 μ L样品PCR扩增产物和相应电泳上样缓冲液（Loading Buffer）按比例混匀后加入样品孔。在电泳时设立DNA标准分子量作对照。5 V/cm电泳约0.5 h，当溴酚蓝到达底部时停止。在紫外灯下或凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增初预期的特异性DNA电泳带，拍摄并记录。

5、结果判定

- 5.1 ISA一步法RT-PCR后阳性对照出现一条304 bp的DNA片段。阴性对照和空白对照没有该核酸带。
- 5.2 待测样品在相应304 bp DNA位置上有带，可判阳性。无带或带的大小不是304bp的判为阴性。

6、相关技术信息

引物序列

ISAV F: 5' -GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3'

ISAV R: 5' -GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3'

公司地址：

北京市海淀区香山路中国林业科学研究
院林木遗传育种国家重点实验室B座

邮政编码：100091

联系电话: 400-895-2698;

010-62824033

传 真：010-62824033

邮 箱：haisentong@126.com

公司主页：

www.halcyonbio.com

在线QQ客服：

737481857

1632557907