

虾黄头病毒（YHV）荧光 RT-PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-804-1

黄头病（YHD）在亚洲各国的养殖斑节对虾和南美白对虾等中流行，但是近年来在美洲也有发生。对虾患病初期食欲特别旺盛，然后突然停止吃食，在 2-4 天内出现死亡。其临床症状为头胸部因肝胰腺发黄而变成黄色，显得特别软。虾黄头病是一种由虾黄头病毒（YHV）引起的严重威胁虾养殖的疫病，目前该群病毒有 6 个已知的基因型，YHV(基因 1 型)是其中的一个型，并且是黄头病的唯一病原。鳃联病毒（Gill associated virus, GAV）属于基因 2 型。GAV 和其他几个型（基因 3 型~6 型）在东非、亚洲和澳大利亚的健康斑节对虾中比较常见，但很少引发疾病。yvh 为有囊膜的杆状病毒，其基因组为单正链 RNA。

为了适应黄头病病毒（YHV）快速检测和疫病研究的需要，本公司根据 SN/T1151.4-2003 虾黄头病检疫技术规范中推荐的引物和探针序列，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、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
YHV 荧光 RT-PCR 反应液	750μL×1 管
酶混合物	60μL×1 管
阴性对照	1ml×1 管
YHV 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。

随机取 5 只-10 只新鲜的虾作为采样标本，采集的部位包括：虾头部的鳃丝、肝胰腺、淋巴器官或血淋巴等组织（可部分或全部采集这些组织）。对于仔虾或稚虾，取整只虾或虾头作为样品；虾粪便直接匀浆待检。于已洗净、灭菌并烘干的研钵中按每克样品加入 1ml TN 缓冲液充分研磨后用于检测。

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

公司地址：	联系电话：400-895-2698；	公司主页：
北京市海淀区香山路中国林业科学研究	010-62824033	www.halcyonbio.com
院林木遗传育种国家重点实验室 B 座	传 真：010-62824033	在线 QQ 客服：
邮政编码：100091	邮 箱：haisentong@126.com	737481857
		1632557907

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）：

4.1.1.1 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 PCR 检测的模板，无需提取核酸）

4.1.1.2 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。

4.1.1.3 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。

4.1.1.4 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。

4.1.1.5 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 11 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 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，向每个荧光 RT-PCR 管中各分装 16 μL ，转移至样本处理区。

4.1.2.2 加样（样本处理区进行）：

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

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 μL，盖紧管盖，500 r/min离心30 s。

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：42 °C /40 min；70 °C /10 min；94 °C /2 min；

第二阶段：94 °C /20 sec，55 °C /20 sec，72 °C /30 sec，5个循环；

第三阶段：94 °C /20 sec，59 °C /40 sec，40个循环，在59 °C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YHV核酸。

4.2.3.2 阳性

Ct值≤30，且出现典型的扩增曲线，示样品中存在YHV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）

F: 5' AGGCGTCTATGACTTCGAGACAT 3'

R: 5' ACGGCGTTGAGAGCTTTGAT3'

probe: 5' -FAM-TCGTCCCGCAATTGTGATC-TAMRA-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