鱼传染性造血器官坏死病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

Detection Kit for Infectious Haematopoietic Necrosis of Fish (PCR-Fluorescence Probing) Protocol

一、检验原理

本试剂盒采用RT-PCR方法结合荧光探针的扩增检测技术，反应在同一管内连续进行，操作简单，并有效防止了污染，能对样品中的鱼传染性造血器官坏死病毒RNA进行快速检测。本试剂盒参照检测标准WOAH《水生动物诊断试验手册》（2024）第2.3.5章进行研制。

二、用途

本试剂盒适用于鱼组织样品的鱼传染性造血器官坏死病毒的特异性检测。

三、试剂盒组成

组分	规格 24T/盒	规格 48T/盒
核酸扩增反应液 (蓝盖管)	1管 (400 µl)	1管 (800 µl)
鱼传染性造血器官坏死病毒 反应液 (紫盖管)	1管 (50 µl)	1管 (100 µl)
鱼传染性造血器官坏死病毒 阳性对照 (红盖管)	1管 (50 µl)	1管 (100 µl)
阴性对照 (绿盖管)	1管 (1000 µl)	1管 (1000 µl)
RT-PCR酶混液 (橙盖管)	1管 (50 µl)	1管 (100 µl)
使用说明书	1份	1份

注意：不同批号的组分不可以互换使用，试剂盒中组分（包括阳性对照）使用前需完全融化并充分混匀（建议采用轻弹或颠倒的方式混匀，不建议使用涡旋振荡器混匀），应尽量避免反复冻融！

四、荧光PCR仪器适用范围

ABI系列，Roche系列，BIO-RAD（含MJ）系列等荧光定量PCR检测仪等。

五、储存条件及有效期

本试剂盒于-20℃保存，有效期为12个月。

六、产品性能指标

本试剂盒的最低检测限为500 copies/ml。

七、操作方法

1. 样本前处理

取 25 mg~100 mg 样本，加入 150 µl CTAB 溶液，用组织研磨器将样品匀浆，转入 1.5ml 离心管中，再加入 CTAB 溶液至 900 µl 并混匀，25℃作用 2h ~ 2.5h。如果是有 CPE 的细胞悬液，则取 450 µl 细胞悬液加入 450 µl CTAB 溶液混匀，25℃作用 2h ~ 2.5h。

2. 样品RNA提取（样本处理区）

参照国家标准《GB/T 15805.2-2017传染性造血器官坏死病诊断规程》进行样本RNA提取。也可按照商品化提取试剂盒进行提取或常规方法提取。阴性对照参与提取，以对环境进行监控。阳性对照无需提取，直接使用。

3. 反应组分配制

根据不同的PCR仪选择反应管，反应总体积为25 µl，反应液与酶在**配液区**配制，加样在**样本处理区**，每个测试反应体系配制如下表：

组分	反应管	检测管	对照管	
			阳性对照	阴性对照
核酸扩增反应液		16 µl	16 µl	16 µl
鱼传染性造血器官坏死病毒 反应液		2 µl	2 µl	2 µl
RT-PCR酶混液		2 µl	2 µl	2 µl
鱼传染性造血器官坏死病毒 阳性对照		—	5 µl	—
阴性对照		—	—	5 µl
样品RNA		5 µl	—	—
总体积		25 µl	25 µl	25 µl

4. 扩增（检测区）

按下列参数设置反应条件：

反应参数	反转录	预变性	45个循环	
			变性	退火/延伸
温度	50℃	95℃	95℃	55℃
时间	15 min	3 min	5 sec	35 sec

荧光信号采集设定在退火/延伸时。对于多通道荧光 PCR 仪，选择荧光素 FAM 为信号采集通道，淬灭基团选 None，染料校正选 None。

5. 结果分析和判定

5.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。基线和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。

5.2 质控标准

5.2.1 阴性对照无典型S型扩增曲线显示或无Ct值。

5.2.2 阳性对照的Ct值应 <30.0 ，并出现典型的扩增曲线。否则，此次实验视为无效。

5.3 结果描述及判定

5.3.1 阴性：无Ct值或Ct值 >37.0 ，表示样本阴性或者被检测样本核酸浓度含量低于试剂盒检测限。

5.3.2 阳性：Ct值 ≤ 37.0 ，且出现明显的指数增长期，表示样本阳性。

5.3.3 确认：对阳性结果，可采用其他方法进行确认。

八、试剂盒使用注意事项

1. 有关实验室管理规范请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范执行。
2. 本试剂盒仅用于体外检测，操作人员应经过专业培训并具有一定经验，开始检测前请仔细阅读本说明书全文。
3. 实验请严格分区操作：第一区：PCR前准备区或配液区，准备扩增所需试剂；第二区：样本处理区，待测样本和对照品处理；第三区：检测区，PCR扩增检测。
4. 所用的枪头和离心管都要经DEPC水处理，以灭活RNA酶。75%乙醇也要用DEPC处理过的水配制。
5. 试剂盒内各试剂使用前，充分融化后请稍微离心。反应液分装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。
6. 若阳性对照未充分混匀，可能出现阳性对照结果异常/不起线的情况。
7. 各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染，实验后请立即清洁工作台。实验中用过的吸头请直接打入盛有1%次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。扩增完毕取出反应管后，立即密封在专用塑料袋内，丢弃于指定地点。工作台及各物品定期用1%次氯酸钠、75%酒精或紫外灯进行消毒。