

急性肝胰腺坏死 (AHPND) 荧光 PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)
 (50 reactions)

1、试剂盒简介

货号：HB-809-3

为了适应虾急性肝胰腺坏死 (AHPND) 快速检测和疫病研究的需要，本公司根据 OIE 手册中提供的参考序列和信息并在其基础上优化改进，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、安全操作简单、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提取试剂和核酸扩增试剂，具体组成参见表 1：

表 1：试剂盒组成 (50test/盒)

组成成分	体积
样品 DNA 提取液 1	5ml × 1 管
样品 DNA 提取液 2	500μl × 1 管
核酸扩增试剂： DEPC 水	5ml × 1 管
AHPND 荧光 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
AHPND 荧光阳性对照	1ml × 1 管

*保存条件：样品 DNA 提取液 1、2 和试剂盒须在 -20℃ 保存。

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。

取组织标记后置于离心管中，按照试剂盒配套的 DNA 抽提试剂操作说明提取 DNA 模板。

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、检测步骤

4.1 DNA 核酸提取操作方法 (在样本处理区进行)：

4.1.1 取 n 个 1.5ml 灭菌 Eppendorf 管，其中 n 为待检样品数和一管阴性对照之和，对每个管进行编号标记。(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)

4.1.2 每管加入 100 μl DNA 提取液 1，然后分别加入待测样本和阴性对照各 100μl，一份样本换用一个吸头；混匀器上震荡混匀 5 s，于 4℃~25℃ 条件下，12 000 r/min 离心 10 min。

4.1.3 尽可能吸弃上清且不碰沉淀，再加入 10μl DNA 提取液 2，混匀器上震荡混匀 5s，于 4℃~25℃ 条件下，2 000 r/min 离心 10 s。

4.1.4 100°C 干浴或沸水浴 10 min; 加入 90μl DEPC 水, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 即为提取的 DNA, 冰上保存待用 (提取的 DNA 需在 2 h 内进行 PCR 扩增或放置于-70°C 冰箱内保存)。

4.2 荧光 PCR 检测

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 μL	0.5 μL	15 μL

4.2.2 加样 (样本处理区进行) :

向每个荧光 PCR 管孔中各分装 15 μL 的混合液, 再分别加入样本 DNA 模板 10 μL, 盖紧管盖, 500 r/min 离心 30 s。 (注: 阳性对照不需要提取核酸, 可以直接吹打混匀后吸取当模板)

4.2.3 PCR 检测 (在检测区进行) :

循环条件设置:

第一阶段, 94°C/3 min;

第二阶段, 94°C/15 sec, 60°C/1 min, 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。

5、结果判定

5.1 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。

5.2 质控标准

5.2.1 阴性对照无 Ct 值或无扩增曲线。

5.2.2 阳性对照的 Ct 值应<25.0, 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值或无扩增曲线, 示样品中无AHPND核酸。

5.3.2 阳性: Ct值≤30, 且出现典型的扩增曲线, 示样品中存在AHPND核酸。

5.3.3 有效原则: Ct>30的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性, 否则为阳性。

6、相关技术信息

F: TTGGACTGTCTGAACCAAACG

R: GCACCCCATTTGGTATTGAATG

probe: 5'-FAM-AGACAGCAAACATACCTATCATCCCGGA-TAMRA-3'