

## 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 SC/T7233-2020《急性肝胰腺坏死病诊断规程》中的参考序列和引物探针序列在其基础上优化改进,开发生产了本试剂盒。同时,该试剂盒引物探针序列也符合 OIE 水生动物疾病诊断手册 2.2.1 章(2021 年网络查新)的要求。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 10 $\mu$ l DNA 提取液 2，混匀器上震荡混匀 5s，于 4 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 条件下，2 000 r/min 离心 10 s。

4.1.4 100 $^{\circ}$ C 干浴或沸水浴 10 min；加入 90 $\mu$ l 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 $^{\circ}$ 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 $\times$ 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 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	15 $\mu$ L

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  $\mu$ L 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 10  $\mu$ L，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 $^{\circ}$ C/3 min；

第二阶段，94 $^{\circ}$ C/15 sec，60 $^{\circ}$ 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 $\leq$ 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: TTGGACTGTCGAACCAAACG

R: GCACCCCATTTGGTATTGAATG

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