

急性肝胰腺坏死病菌（AHPND）嵌套 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-809-2

为了适应虾的急性肝胰腺坏死病病原细菌（Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND）快速检测和监测的需要，本公司参照2015年NACA亚太水产养殖网络中心颁布的嵌套PCR检测方法和推荐的引物序列，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、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）

组成成分	体积
核酸扩增试剂： DEPC 水	1ml×1 管
AHPND 嵌套 PCR 反应液	750μl×1 管
Taq 酶(5U/ul)	40μl×1 管
阴性对照	1ml×1 管
AHPND 嵌套阳性对照	1ml×1 管

3、嵌套 PCR 检测

3.1 样本的处理（在样本制备区进行）：

如果PCR后产物电泳时看不到DNA带，取2.5 μL产物做模板；如果PCR后产物电泳时能看到DNA带，只是要求进一步核实，则需将产物按1：1 00稀释后，取2.5 μL产物做模板。

3.2 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嵌套PCR反应液、Taq酶，在室温下融化后，2 000 r/min离心5 s。设所需嵌套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	PCR 反应液	Taq 酶	合计
用量	14.5 μL	0.5 μL	15 μL

3.3 加样（样本处理区进行）：

向每个PCR管中各分装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。

3.4 PCR 检测（在检测区进行）：

公司地址：	联系电话: 400-895-2698;	公司主页：
北京市海淀区天香山路中国林业科学研	010-62824033	www.halcyonbio.com
究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

循环条件设置:

第一阶段, 94°C/2 min;

第二阶段, 94°C/20 sec, 55°C/20 sec, 72°C/20 sec, 25 次循环;

第三阶段, 72°C延伸 10min, 4 °C 保温

3.5 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, 使电泳缓冲液刚好没过胶面, 向 PCR 扩增产物中加入 1/6 体积的电泳上样缓冲液 (6X 上样缓冲液), 按比例混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA DL2000 Marker 做对照。5 V/cm 电泳约 0.5h, 当溴酚蓝到达一定位置时停止。在紫外灯下或凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 电泳带, 拍摄并记录。

4、结果判定

4.1 PCR 后, 阳性对照会出现一条 230 bp 的 DNA 片段。阴性对照和空白对照没有该核酸带。

4.2 待测样品 PCR 扩增后能在相应 230 bp DNA 位置上有带, 可判为 AHPND 病原菌核酸阳性。

5、相关技术信息

AP4-F2 TTGAGAATACGGGACGTGGG

AP4-R2 GTTAGTCATGTGAGCACCTTC

公司地址:

北京市海淀区天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