

包拉米虫感染 (Infection with Bonamiosis)

荧光 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-910

本试剂盒采用OIE水生动物疾病诊断手册2.4.3 (2020版) 推荐的牡蛎包拉米虫TagMan荧光PCR引物和探针序列，检测组织样品总DNA中包拉米虫DNA，可特异性检出包拉米虫属的核酸，本试剂盒采用特异性的引物和探针扩增目的基因，并制备了阳性对照用于结果判定，通过优化的反应体系，能够最大限度地检测包拉米虫核酸。

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
包拉米虫荧光 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
包拉米虫荧光 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。按相关检测标准推荐的方法，取贝类组织30mg标记后置于离心管中，按照试剂盒配套的DNA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℃ 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，

公司地址：北京市顺义区南法信顺畅大道 14 号院东亚首航国际 1 号楼 3 层 329 室

公司网址：www.halcyonbio.com

邮 箱：haisentong@126.com

电话：010-50933811, 13718421576, 17718526815

客服 QQ：737481857 835171324

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℃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 KHV 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℃/3 min；

第二阶段，92℃/15 sec，53℃/15 sec，60℃/30s，40个循环，在每次循环的60℃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<28.0，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，示样品中无包拉米虫核酸。

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

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

Taqman 探针：5'-FAM-TTAGGTGGATAAGAGCCGC-MGBNFQ-3'

上游引物 F：5'-CCCTGCCCTTTGTACACACC-3'

下游引物 R：5'-TCACAAAGCTTCTAAGAACGCG-3'