

鲑鱼立克次氏体嵌套 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-713

鱼类立克次氏体病最早发现于 20 世纪 30 年代末，其病原立克次氏体为寄生型原核微生物，暂时被分类为鱼立克次氏体科。该病原目前在全世界数十个国家和地区流行，可以导致被感染鱼类内脏肿大、出血，死亡率可高达 90%，因其主要感染鲑科鱼类，所以也称为鲑鱼立克次氏体病。

为了适应鲑鱼立克次氏体病原快速检测和疫病研究的需要，本公司参照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准《鲑鱼立克次氏体检疫技术规范-巢式聚合酶链式反应法》(SN/T 2976-2011) 中规定的引物序列，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、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 × 2 管
第一轮 PCR 反应液	750μl × 1 管
第二轮 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	60μl × 1 管
阳性对照	1ml × 2 管
鲑鱼立克次氏体 阴性对照	1ml × 2 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。

体长小于 4 cm 的幼鱼取整鱼，大于 4 cm 的取病变的肝、脑、脾、肾和胃等脏器约 2g 于已洗净、灭菌并烘干的研钵中充分研磨，加 5ml PBS 混匀，2 000r/min 离心 10min 取上清转入无菌离心管中备用。或取有可疑细胞病变的细胞悬液用于检测。

3.2 存放：研磨后的样本在 2 °C—8 °C 条件下保存应不超过 24 h；-70 °C 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 为待检样品数与阴性对照之和，对每个管进行编号

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

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 μ l DNA 提取液 1，然后分别加入待测样本、阴性对照和阳性对照(阳性对照吸取前充分混匀)各 100 μ l，一份样本换用一个吸头；混匀器上震荡混匀 5 s，于 4 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 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 μ 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 μ 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 PCR 检测

4.2.1 扩增试剂准备（在反应混合物配制区进行）：

本试剂盒包括两轮扩增：

第一轮扩增：从试剂盒中取出对应的第一轮 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：

试剂	PCR 反应液	Taq 酶	合计
用量	14.5 μ L	0.5 μ L	15 μ L

加样（样本处理区进行）：向每个 PCR 管孔中各分装 15 μ L 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 10 μ L，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。

第二轮扩增：将第一轮产物用去离子水稀释 10 倍，取 2 μ L 做为第二轮扩增的模板，其他体系不变。

4.2.3 PCR 检测（在检测区进行）：

第一轮循环条件设置：

第一阶段，94 $^{\circ}$ C/5 min；

第二阶段，94 $^{\circ}$ C/1 min，50 $^{\circ}$ C/2 min，72 $^{\circ}$ C/1 min，35 个循环；

第三阶段，72 $^{\circ}$ C 延伸 10min，4 $^{\circ}$ C 保温。

第二轮循环条件设置：

第一阶段，95 $^{\circ}$ C/5 min；

第二阶段，95 $^{\circ}$ C/1 min，62 $^{\circ}$ C/1 min，72 $^{\circ}$ C/1 min，35 个循环；

第三阶段，72 $^{\circ}$ C 延伸 10min，4 $^{\circ}$ C 保温。

4.3 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。

5、结果判定

第二轮 PCR 后，阳性对照会出现一条 469 bp 的 DNA 片段。阴性对照和空白对照没有该核酸条带，待测样品 PCR 扩增后能在相应 469 bp DNA 位置上有带，可判为鲑鱼立克次氏体核酸阳性



(注：第一轮产物无需跑胶检测，如检测，阳性对照应出现一条 1537 bp 的 DNA 片段，待测样品出现相同大小的微弱条带或无条带)

6、相关技术信息

第一轮引物：

F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

R: AAGGAGGTGATCCANCCRCA

第二轮引物：

F: CTAGGAGATGAGCCCGCGTTG

R: GCTACACCTGAAATTCCACTT