

加州念珠菌感染 (Infection with *Xenohaliotis californiensis*)

普通 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-907-2

加州念珠菌感染 (Infection with *Xenohaliotis californiensis*) 也称加州立克次体感染、鲍立克次体病或鲍枯萎综合症 (Withering syndrome of Abalone, WSA)。该病原为加州立克次体 (*Xenohaliotis californiensis*)，属立克次体目 (*Rickettsiales*) 无形体科 (*Anaplasmataceae*)。该病在北美洲西南海岸一带流行，随着出口已经传播到中国、智利、冰岛、爱尔兰、西班牙、以色列、泰国和日本等国家。该病原通过侵袭消化腺上皮细胞，造成被感染个体生长发育迟缓、厌食、嗜睡、虚弱和严重的腹足肌肉萎缩，进而丧失吸附能力。

为了适应加州念珠菌感染快速检测和疫病研究的需要，本公司参照 OIE 国际标准提供的目标基因序列和引物，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)

试剂盒组成成分	体积
核酸提取试剂： 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
加州念珠菌 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
加州念珠菌 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，取病样 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

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

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 μ l DNA 提取液 1，然后分别加入待测样本和阴性对照各 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）：

从试剂盒中取出 PCR 反应液、Taq 酶，2000 g 离心 5 sec。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 μ L	0.5 μ L	15 μ L

4.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个 PCR 管中各分装 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。

4.2.3 PCR 检测（在检测区进行）：

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/30 sec；72 $^{\circ}$ C/30 sec；40 个循环；

第三阶段，72 $^{\circ}$ C/10 min；

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，使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将 PCR 扩增产物和相应电泳上样缓冲液（Loading Buffer）按比例混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA 标准分子量作对照。5 V/cm 电泳约 0.5 h，当溴酚蓝到达底部时停止。在紫外灯下或凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增初预期的特异性 DNA 电泳带，拍摄并记录。

5、结果判定

5.1 加州念珠菌阳性对照 PCR 后会出现一条 160 bp 的 DNA 片段。阴性对照和空白对照没有该核酸带。

5.2 待测样品 PCR 扩增后能在相应 160 bp DNA 位置上有带，可判为加州念珠菌阳性。

6、相关技术信息

引物序列

F: 5' -GTTGAACGTGCCTTCAGTTTAC-3'

R: 5' -ACTTGACTCATTCAAAAGCGGA-3'

公司地址：

北京市海淀区香山中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