

派琴虫 (Perkinsosis) 荧光 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-911-1

本试剂盒采用GB/T26618-2011派琴虫病诊断操作规程中推荐的派琴虫TagMan荧光PCR引物和探针序列，检测组织样品总DNA中派琴虫DNA，可特异性检出派琴虫的核酸，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派琴虫核酸，为符合国标要求的配套产品。

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
派琴虫荧光 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
派琴虫荧光阳性对照	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，使用前应颠倒混匀)

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。

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 电话：010-50933955, 13718421576, 18610566381

邮 箱：haisentong@126.com 客服 QQ：737481857 1632557907

4.1.4 100°C 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, 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°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 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。

4.2.3 PCR 检测 (在检测区进行):

循环条件设置:

第一阶段, 94°C/3 min;

第二阶段, 94°C/15 sec, 55°C/15 sec, 60°C/30s, 40 个循环, 在每次循环的 60°C 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, 示样品中无派琴虫核酸。

5.3.2 阳性: Ct 值 ≤ 30, 且出现典型的扩增曲线, 示样品中存在派琴虫核酸。

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

Perk 上游引物 CAAACTCTCAACGATGGATGCC

Perk 下游引物: TGCAAATCGCAGTGCTTATCG

Perk 荧光探针: 5'-FAM-ACTTCGCTGCGTCCTTCATCGATTCTCG-Eclipse-3'