

螯虾瘟(丝囊霉菌)荧光 PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of crayfish plague
 (50 reactions)

1、试剂盒简介

货号：HB-811-1

螯虾瘟的病原体是丝囊霉菌（crayfish plague），现可将丝囊霉菌分为 A 到 D 四个型。迄今为止，所以淡水螯虾都对丝囊霉菌易感，甲壳表皮最先被感染，腹侧与腹部接合处周围的软表皮最易被感染。高度易感的螯虾品种在感染后短时间内就可达到很高的死亡率。为了适应螯虾瘟（丝囊霉菌）快速检测和疫病研究的需要，本公司根据 OIE 手册中提供的 MGB 荧光 PCR 引物和探针序列和信息并在其基础上优化改进，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）

| 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 |
| 螯虾瘟荧光 PCR 反应液 | 750μl × 1 管 |
| Taq 酶 (5U/ul) | 40μl × 1 管 |
| 阴性对照 | 1ml × 1 管 |
| 螯虾瘟荧光阳性对照 | 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。

活螯虾从采样到运至实验室检测所用时间不应超过 24h。如在疑似螯虾瘟暴发的地区仅能找到死亡螯虾，也可采集这些样品用于诊断。根据具体情况，可采用：a 冷藏运输（如新近死亡的螯虾），或 b 保存在最低浓度为 70% 的乙醇中。取高度易感品种的腹部软表皮最适用于提取样品 DNA，首先清除腹部软表皮表面的污染物，用经高压灭菌和水蒸气处理的一次性湿纸巾彻底擦拭腹部软表皮，切取 30-50mg 的组织并置于研钵中研磨。为了确诊，可从腹部软表皮、尾节和尾足分别取 30-50mg 的组织并予以分别处理。按照试剂盒配套的 DNA 抽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

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

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 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 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荧光 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 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 μ L | 0.5 μ L | 15 μ L |

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 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/3 min;

第二阶段, 95 $^{\circ}$ C/15 sec, 58 $^{\circ}$ C/1 min, 50 个循环; 在第二阶段每次循环的退火延伸时收集荧光。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 $<$ 25.0, 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, 示样品中无螯虾瘟 (丝囊霉菌) 核酸。

5.3.2 阳性: Ct值 \leq 30, 且出现典型的扩增曲线, 示样品中存在螯虾瘟 (丝囊霉菌) 核酸。

6、相关技术信息

正向引物 AphAstITS-39F(5`AAG-GCT-TGT-GCT-GGG-ATG-TT-3`)

反向引物 AphAstITS-97R (5`-CTT-CTT-GCG-AAA-CCT-TCT-GCT-A-3`)

TaqMan MGB 探针为 AphAstITS-60T (5`-6-FAM-TTC-GGG-ACG-ACC-CMGBNF-Q-3`)