

## 牡蛎疱疹病毒感染荧光 PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of OsHV1

(50 reactions)

### 1、试剂盒简介

货号：HB-909

为了适应牡蛎疱疹病毒（Infection with ostreid herpesvirus 1 microvariants）（OsHV1）微变株的快速检测和疫病研究的需要，本公司参照OIE发布的水生动物疾病诊断手册2.4.5章中推荐的荧光PCR引物和探针序列和检测方法。经多次实验及系统优化，开发生产了本试剂盒。应用本试剂盒进行核酸提取和PCR检测具有快速、灵敏、特异、准确、安全、操作简单、应用广泛等特点及优点。

### 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
OsHV1 荧光 PCR 反应液	750μl ×1 管
Taq 酶(5U/ul)	40μl ×1 管
阴性对照	1ml ×1 管
OsHV1 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

采集活的或濒死的软体动物，幼体（100-200mg），仔体（100-200mg）或2-3 mm<sup>2</sup>外套膜的切片，保存在95%的乙醇中或者-80℃保存。

#### 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)：

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

- 4.1.1 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  $\mu$ l DNA 提取液 1，然后分别加入待测样本和阴性对照各 100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	15 $\mu$ L

### 4.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个 PCR 管中各分装 15  $\mu$ L 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 10  $\mu$ L，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。

### 4.2.3 荧光 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：

第一阶段，94 $^{\circ}$ C/3 min；

第二阶段，92 $^{\circ}$ C/15 s，55 $^{\circ}$ C/15s，60 $^{\circ}$ C/30 s；40 个循环；在每次循环的 60 $^{\circ}$ C 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 < 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 OsHV1 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 OsHV1 核酸。

### 5.4 有效原则

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



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

### 6.1 引物序列

OsHV F: 5'-GTCGCATCTTTGGATTTAACAA-3'

OsHV R: 5'-ACTGGGATCCGACTGACAAC-3'

Probe: 5'-FAM-TGCCCTGTCATCTTGAGGTATAGACAATC-TAMRA-3'