

## 杀蛎包拉米虫感染 (Infection with *Bonamia exitiosa*)

### PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of Infection with *Bonamia exitiosa*

(50 reactions)

#### 1、试剂盒简介

货号：HB-902

包拉米虫感染的病原主要指牡蛎包拉米虫 (*Bonamia ostreae*) 和杀蛎包拉米虫 (*Bonamia exitiosa*)。包拉米虫感染 (Infection with *Bonamia*) 是一种侵袭牡蛎血细胞的致死性传染病。杀蛎包拉米虫分布在澳大利亚和新西兰；牡蛎包拉米虫分布在欧洲和美国的部分地区。患病牡蛎的鳃及外套膜有时褪色成黄色，并出现广泛的损伤，导致牡蛎死亡。但大多数受感染的牡蛎外表正常。

为适应软体动物的牡蛎包拉米虫寄生虫快速检测和监测的需要，本公司参照OIE发布的水生动物疾病诊断手册2.4.02章中推荐的PCR引物序列和检测方法。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
杀蛎包拉米虫 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
杀蛎包拉米虫 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

将新鲜牡蛎的消化腺上皮、腮、触须等组织 25mg 置于冰冷的生理盐水中反复冲洗，滤纸吸干表面水分后称量（根据需要），置于匀浆研磨器中并加入冷的生理盐水，进行手工匀浆研磨。注意整个过程在冰上完成。

##### 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)
- 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 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 $\times$ 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	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 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：

第一阶段，94 $^{\circ}$ C/5 min（预变性）；

第二阶段，94 $^{\circ}$ C/1 min 变性，55 $^{\circ}$ C/1 min 退火，72 $^{\circ}$ C/1 min 延伸，30 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 0.5 h，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

### 5.1 质量控制

PCR 后，阳性对照会出现一条 304 bp 的 DNA 片段。阴性对照和空白对照没有该核酸带。

### 5.2 扩增产物

待测样品 PCR 扩增后能在相应 304bp DNA 位置上有带，可判为杀蛭包拉米虫核酸阳性。确诊前需进行 PCR 产物测序。

## 6、相关技术信息

F: 5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3'

R: 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GATCCC-CC-3'