

海水派琴虫感染 (Infection with *Perkinsus marinus*)

PCR检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of Infection with *Perkinsus marinus*
 (50 reactions)

1、试剂盒简介

货号：HB-905

为了适应贝类海水派琴虫 (*Perkinsus marinus*) 的快速检测和疫病监测的需要，本公司严格依据 OIE 水生动物疫病诊断手册中规定的相应 PCR 检测引物序列及其循环参数等技术标准，在本公司严谨的产品质量保证体系管控下生产和质检。确保本试剂盒满足 OIE 中海水派琴虫的检测标准要求。本试剂盒具有快速灵敏、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
海水派琴虫 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
海水派琴虫阳性对照	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

取新鲜贝类的消化腺上皮、腮、触须等组织 25 mg 置于冰冷的生理盐水中反复冲洗，滤纸吸干表面水分后称重 (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 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 \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 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 /4 min;

第二阶段, 94 $^{\circ}$ C/1 min, 57 $^{\circ}$ C/1 min; 65 $^{\circ}$ C/3 min; 40个循环;

第三阶段, 65 $^{\circ}$ C/10 min;

第四阶段, 4 $^{\circ}$ C 保存

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 海水派琴虫的PCR后阳性对照会出现一条509 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 509 bp DNA 位置上有带, 可判为海水派琴虫阳性。



6、相关技术信息

6.1 引物序列

F: 5' -CTT-TTG-YTW-GAG-WGT-TGC-GAG-ATG-3'

R: 5' -CGA-GTT-TGC-GAG-TAC-CTC-KAG-AG-3'