

龟疱疹病毒 (CFPHV) 嵌套 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-1002-2

为了适应龟疱疹病毒 (CFPHV) 的快速检测和疫病监测的需要，本公司严格依据 Page-Karjian et al. SpringerPlus 2012, 1:35 权威文献推荐的相应嵌套 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。确保本试剂盒满足龟疱疹病毒的检测标准要求。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
核酸扩增试剂： DEPC 水	8ml × 1 管
龟疱疹嵌套 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
龟疱疹阳性对照	1ml × 1 管

3、嵌套 PCR 检测

3.1 样本的处理 (在样本制备区进行)：

嵌套PCR：如果PCR后产物电泳时看不到DNA带，取2.5 μL产物做模板；如果PCR后产物电泳时能看到DNA带，只是要求进一步核实，则需将产物按1：100稀释后，取2.5 μL产物做模板。向每个PCR管孔中各分装15 μL的混合液，再加入普通PCR产物模板2.5 μL，补加DEPC水7.5 μL，盖紧管盖，500 r/min离心30 s。

3.2 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嵌套PCR反应液、Taq酶，在室温下融化后，2000 r/min离心5 s。设所需嵌套PCR检测总数为n，其中n为被检样品、阳性对照与阴性对照的和，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 μL	0.5 μL	15 μL

3.3 加样 (样本处理区进行)：

在各设定的PCR管中分别加入上述样本处理步骤3.1中制备的DNA溶液各2.5 μL，补加DEPC水7.5 μL，盖紧管盖，500 r/min离心30 s。(注：试剂盒中的阳性对照在加入之前应颠倒混匀后直接吸取作为PCR检测的模板，无需提取核酸)

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

3.4 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：

第一阶段，95 °C /4 min；

第二阶段，94 °C/1 min, 62 °C/1 min; 65 °C/3 min; 40个循环；

第三阶段，65 °C/10 min；

第四阶段，4 °C 保存

4、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 0.5h，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 嵌套 PCR 后，阳性对照会出现一条 364 bp 的 DNA 片段。阴性对照和空白对照没有该核酸带。

5.2 嵌套 PCR 扩增后能在相应 364 bp DNA 位置上有带，可判为龟疱疹病毒核酸阳性。

6、相关技术信息

F: 5' CGGCGAGCCGAAACGCTCAAGG 3'

R: 5' TCCGTTCCCCAGCGGGTGTGAA 3'