

## 箭毒蛙壶菌荧光 PCR 检测试剂盒说明书

### 1、试剂盒简介

货号：HB-1003-1

本试剂盒依据世界动物卫生组织（OIE）水生动物诊断手册 2019 版 2.1.1 章箭毒蛙壶菌（*Batrachochytrium dendrobatidis*）检测方法和 SN/T3993-2014《箭毒蛙壶菌感染检疫技术规范》中推荐的荧光 PCR 检测序列和循环参数开发生产。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）

试剂盒组成成分	体积
核酸扩增试剂： DEPC 水	5ml × 1 管
箭毒蛙壶菌荧光 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
箭毒蛙壶菌阳性对照	1ml × 1 管

\*保存条件：样品 DNA 提取液 1、2（选配）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

按 SN 或 OIE 标准推荐的采集方法和采集部位采集样品，如拭子、浸泡液或组织。

#### 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、一管阳性对照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，用前需吹打混匀）

4.1.2 每管加入 100 μl DNA 提取液 1，然后分别加入待测样本、阴性对照和阳性对照（阳性对照吸取前充分混匀）各 100μl，一份样本换用一个吸头；混匀器上震荡混匀 5 s，于 4℃~25℃ 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 10μl DNA 提取液 2，混匀器上震荡混匀 5s，于 4℃~25℃ 条件下，2 000 r/min 离心 10 s。

4.1.4 100℃ 干浴或沸水浴 10 min；加入 90μl 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℃ 冰箱内保存）。

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

## 4.2 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×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 μL	0.5 μL	15 μL

### 4.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个 PCR 管中各分装 15 μL 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 10 μL，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。（注：阳性对照不需要提取核酸，可以直接吹打混匀后吸取当模板）

### 4.2.3 荧光 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：

第一阶段，50°C /2 min；

第二阶段，95°C/10 min；

第三阶段，95°C/30 s，60°C/1 min； 45 个循环；在每次循环的 60°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 <30.0，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，示样品中无箭毒蛙壶菌核酸。

5.3.2 阳性

Ct 值 ≤ 30，且出现典型的扩增曲线，示样品中存在箭毒蛙壶菌核酸。

5.4 有效原则

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

箭毒蛙壶菌荧光 P: (FAM)5'-CGAGTCGAACAAAAT-3'(MGB)

箭毒蛙壶菌荧光 F: CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC

箭毒蛙壶菌荧光 R: AGCCAAGAGATCCCGTTGTCAAA