

流行性溃疡综合症（EUS）荧光 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-711-1

本公司依据世界动物卫生组织 OIE 国际标准 Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2013 中 2.3.2 中规定的 EUS-ITS11 扩增区域的要求，开发了 EUS 的荧光 PCR 检测试剂盒。可对 EUS 早期诊断和流行病学调查提供新的技术手段。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。核酸的扩增和实时检测采用 TaqMan 方法，探针 5' 端标记 FAM 荧光素为报告荧光基团，3' 端标记 TAMRA 荧光素为淬灭荧光基团。利用荧光探针 TaqMan® 进行标记实现对扩增产物的实时监测。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
EUS 荧光 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
EUS 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

所用取样器材必须经高压灭菌并烘干。取组织标记后置于离心管中，按照试剂盒配套的 DNA 抽提试剂操作说明提取 DNA 模板。

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。

公司地址：	联系电话：400-895-2698；	公司主页：
北京市海淀区香山路中国林业科学研究	010-62824033	www.halcyonbio.com
院林木遗传育种国家重点实验室 B 座	传 真：010-62824033	在线 QQ 客服：
邮政编码：100091	邮 箱：haisentong@126.com	737481857
		1632557907

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 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 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 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 荧光 PCR 检测(在检测区进行):

循环条件设置:

第一阶段, 94 $^{\circ}$ C /2 min;

第二阶段, 92 $^{\circ}$ C/15 s, 50 $^{\circ}$ C/15 s, 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。

公司地址:

北京市海淀区香山路中国林业科学研究
院林木遗传育种国家重点实验室 B 座

邮政编码: 100091

联系电话: 400-895-2698;

010-62824033

传 真: 010-62824033

邮 箱: haisentong@126.com

公司主页:

www.halcyonbio.com

在线 QQ 客服:

737481857

1632557907

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EUS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EUS核酸。为进一步确诊是EUS，建议用普通PCR进行确认或测序。

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

F: 5' -GCTGCGAACTGCGATAC-3'

R: 5' -AAAGGACTTGCCGAAAC-3'

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

公司地址：

北京市海淀区香山路中国林业科学研究
院林木遗传育种国家重点实验室 B 座

邮政编码：100091

联系电话: 400-895-2698;

010-62824033

传 真：010-62824033

邮 箱：haisentong@126.com

公司主页：

www.halcyonbio.com

在线 QQ 客服：

737481857

1632557907