

## 加州念珠菌感染荧光 PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of Infection with *Xenohaliotis californiensis*

(50 reactions)

### 1、试剂盒简介

货号：HB-907-1

加州念珠菌感染 (Infection with *Xenohaliotis californiensis*) 也称加州立克次体感染、鲍立克次体病或鲍枯萎综合症 (Withering syndrome of Abalone, WSA)。该病原为加州立克次体 (*Xenohaliotis californiensis*)，属立克次体目 (*Rickettsiales*) 无形体科 (*Anaplasmataceae*)。该病在北美洲西南海岸一带流行，随着出口已经传播到中国、智利、冰岛、爱尔兰、西班牙、以色列、泰国和日本等国家。该病原通过侵袭消化腺上皮细胞，造成被感染个体生长发育迟缓、厌食、嗜睡、虚弱和严重的腹足肌肉萎缩，进而丧失吸附能力。

为了适应加州念珠菌感染快速检测和疫病研究的需要，本公司参照 OIE 国际标准提供的目标基因序列设计了相应的引物和探针序列，经多次实验及系统优化，开发生产了本试剂盒。应用本试剂盒进行检测具有快速、灵敏、特异、准确、操作简单、应用广泛和高通量检测等特点及优点。

### 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)

组成成分	体积
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
加州念珠菌荧光 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
加州念珠菌荧光阳性对照	750μl × 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。按相关检测标准推荐的方法，取病样 30 mg 标记后置于离心管中，按照试剂盒配套的 DNA 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。

### 4、检测步骤

#### 4.1 DNA 核酸提取操作方法(在样本处理区进行)：

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

- 4.1.1 取  $n$  个 1.5 ml 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℃~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 10  $\mu$ l 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 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℃ 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）：

从试剂盒中取出相应的荧光 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 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	15 $\mu$ L

### 4.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个荧光 PCR 管孔中各分装 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℃/3 min；

第二阶段，94℃/15 sec，60℃/30s，35 个循环，在每次循环的 60℃ 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 阴性对照无扩增曲线、无 Ct 值或 Ct 值  $\geq 30$ ，判为阴性。

5.2.2 阳性对照的 Ct 值  $< 25$ ，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

无扩增曲线、无 Ct 值或 Ct 值  $\geq 30$ ，示样品中无加州念珠菌核酸。

#### 5.3.2 阳性

Ct 值  $\leq 28$ ，且出现典型的扩增曲线，示样品中存在加州念珠菌核酸。

## 6、相关技术信息

F: 5' -GGCAAGTAGCAGACGGGTGA-3'

R: 5' -TTGGACTCATTCAAAAGCGGA-3'

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

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