

虾坏死性肝胰腺炎（NHP）荧光 PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP)
(50 reactions)

1、试剂盒简介

货号：HB-808-1

肝胰腺坏死（Necrotizing Hepatopancreatitis, NHP）在美洲各国流行,影响在海水、半咸水和淡水中的各种对虾，死亡通常发生在养成阶段的中期。临床症状都是非特异性的，如没有活力，无食欲，消瘦，软壳，黑鳃，生长变缓以及肝胰腺萎缩，颜色变淡或发白等。感染虾如果不做任何处理，则死亡率高达 95%。其病原是一种类立克次体即肝胰腺坏死菌（NHP-B）

为了适应对虾坏死性肝胰腺炎快速检测和疫病监测的需要，本公司严格依据 2022 年 OIE 水生动物疫病诊断手册中规定的 NHP 的实时荧光 PCR 检测保守序列的引物探针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）

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
NHP 荧光 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
NHP 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。

应按 GB/T18088 的规定采样。幼体取整体，仔虾取头胸部，幼虾和成虾取小块肝胰腺作为样品。

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 μl DNA 提取液 1，然后分别加入待测样本和阴性对照各 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。

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

4.1.3 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）：

从试剂盒中取出相应的 NHP 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）：

向每个荧光 PCR 管孔中各分装 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/3 min；

第二阶段，95 $^{\circ}$ C/15 sec，60 $^{\circ}$ C/1 min 40 个循环，在第二阶段每次循环的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

阴性对照无 Ct 值或无扩增曲线。

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

阴性：无 Ct 值或无典型扩增曲线，示样品中无 NHP-B 核酸。

阳性：Ct 值 \leq 30，且出现典型的扩增曲线，示样品中存在 NHP-B 核酸。

5.4 有效原则：Ct 值>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（引物和探针序列）

F: 5'-CGT-TCA-CGG-GCC-TTG-TACAC-3'

R: 5'-GCT-CAT-CGC-CTT-AAA-GAA-AAG-ATA-A-3'

Probe: 5'-CCG-CCC-GTC-AAG-CCA-TGG-AA-3'