

HSDS BỘ Ready EHP Screening KIT PCR ĐIỆN DI

1. Giới thiệu chung

Bộ **Ready EHP Screening KIT** được sử dụng để phát hiện tác nhân gây bệnh **EHP** bằng kỹ thuật PCR cơ bản và sử dụng máy điện di kiểm tra.

Nguyên lý hoạt động

- DNA đặc hiệu trên vi bào tử trùng *Enterocytozoon hepatopenaei* gây bệnh EHP được khuếch đại đặc hiệu bằng primer.
- Điện di agarose kiểm tra sản phẩm khuếch đại. Nếu mẫu bị nhiễm EHP, trên bản gel điện di sẽ xuất hiện sản phẩm khuếch đại có kích thước 184 bp trên ánh sáng UV hoặc Blue light.

2. Thành phần bộ KIT

Thành phần	Mô tả	Bảo quản
Tube Ready EHP Screening KIT	Taq polymerase, dNTPs, primer forward, primer reverse	-20°C
Buffer PCR 1X	Buffer hòa tan các thành phần trong tube Ready EHP Screening KIT	-20°C
Positive control (PC)	Mẫu chứng dương	-20°C
Negative control (NC)	Nước không chứa nuclease	2-8°C

3. Phương pháp tiến hành

3.1. Chuẩn bị trước phản ứng

- Rã đông toàn bộ hóa chất
- Tube Ready EHP Screening KIT ly tâm nhanh 5 giây trước khi sử dụng
- Buffer PCR 1X vortex nhẹ và ly tâm nhanh trước khi sử dụng
- Chuẩn bị:
 - NC (Negative Control)
 - PC (Positive Control) vortex nhẹ và ly tâm nhanh trước khi sử dụng
- Làm việc trong tủ sạch (nếu có) để tránh nhiễm chéo

3.2. Chuẩn bị mix phản ứng

Thành phần	Thể tích hút cho một phản ứng
Tube Ready EHP Screening KIT	1 tube
Buffer PCR 1X	35 μL
Tổng thể tích (chưa bơm mẫu)	35 μL

3.3. Bơm mẫu

Loại mẫu	Thể tích
Mẫu thử	5 μ L
Chứng dương (PC)	5 μ L
Chứng âm (NC)	5 μ L

3.4. Chu kỳ nhiệt

Đặt các mẫu đã chuẩn bị vào máy PCR và cài đặt chu trình nhiệt^(*) như sau:

Bước	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ
Biến tính ban đầu (Initial Denaturation)	93°C	10 phút	1
Biến tính (Denaturation)	93°C	15 giây	40
Bắt cặp (Annealing) và kéo dài (Extension)	66°C	30 giây	
Kéo dài cuối Final extension	72°C	2 phút	1
	25°C	1 phút	1

4. Điện di kiểm tra

- Mẫu sau khi PCR: điện di kiểm tra trên gel Agarose

5. Phân tích kết quả

Loại mẫu	Vạch 184bp	Đánh giá bước đầu
Mẫu chứng âm	-	Hóa chất PCR không bị ngoại nhiễm
	+	Hóa chất PCR bị ngoại nhiễm, tiến hành xét nghiệm lại với lô hóa chất mới.
Mẫu chứng dương	+	Phản ứng PCR hoạt động tốt
	-	- Chứng dương bị hỏng, tiến hành xét nghiệm lại với lô chứng dương mới. - Hóa chất PCR bị hỏng, tiến hành xét nghiệm lại với lô hóa chất mới.
Mẫu kiểm tra	+	Mẫu dương tính với EHP
	-	Mẫu âm tính với EHP

Đánh giá kết quả:

- Mẫu thử được xem là dương tính với EHP khi thỏa các điều kiện sau:
 - + Giếng mẫu thử có xuất hiện vạch sáng ở kích thước 184 bp,
 - + Giếng mẫu chứng dương có vạch sáng xuất hiện ở kích thước 184 bp,
 - + Giếng mẫu chứng âm không xuất hiện vạch sáng.
- Mẫu thử được xem là âm tính với EHP khi thỏa các điều kiện sau:
 - + Giếng mẫu thử không xuất hiện vạch sáng ở kích thước 184 bp,
 - + Giếng mẫu chứng dương có vạch sáng xuất hiện ở kích thước 184 bp,
 - + Giếng mẫu chứng âm không xuất hiện vạch sáng.