

旋达[®]R1 致病微生物检测系列

霍乱弧菌核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

请于-20℃条件下保存，有效期 15 个月

◆ 产品说明

旋达[®]R1 致病微生物检测系列可针对食品、饲料等样品中的致病微生物的特异核酸片段进行扩增，仪器实时监测扩增过程中的荧光信号变化，自动判读结果。本产品用于霍乱弧菌的检测。**检出限为 10³ CFU/ml。**

◆ 产品组成（48 测试）

011082M	
试剂	含量
A-VC-P	1000μL× 1 支
NG-P	100μL× 2 支
PG-VC-P	100μL× 1 支

◆ 适用仪器

ABI 7500、CFX 96、Mx 3005P、LineGene9600 等实时荧光 PCR 仪。

◆ 自备耗材和仪器

①冰盒；②移液器（0.5-10μL，10-100μL，100-1000μL）及配套灭菌吸头；③离心机；④涡旋混匀器；⑤金属浴；⑥均质机、搅拌机或研钵等研磨器具；⑦电子天平。

◆ 注意事项

1. 本试剂检测灵敏度高。为了防止污染，实验要分区操作。
 - 1) 第一区：试剂准备区。
 - 2) 第二区：样本制备区。
 - 3) 第三区：扩增及产物分析区。

★ 分区之间最好进行物理性隔离，避免人为因素造成的污染。
2. 实验过程中穿戴工作服和乳胶手套，不同区域独立使用工具，需更换手套和实验服。
3. 严格按照操作步骤操作，试剂配制和加样等步骤请严格按照说明书要求在冰盒上操作。
4. 反应液中的成分对光敏感，应**避光保存**。试剂使用前要完全解冻，但应避免反复冻融，推荐使用前离心 30 秒，并按检测频次将反应液以适当体积分管保存。
5. 反应结束后，扩增管请置于密封袋内丢弃，当日清理，开盖易造成气溶胶污染，禁止开盖。
6. 不同批号试剂**请勿混合使用**，在有效期内使用。

◆ 样品处理

参照《SN/T 1022-2010 进出口食品中霍乱弧菌检验方法》中的 7.1 和 7.2 处理样品，对样品进行前增菌，制备的菌液保存待用。

以无菌操作取检样 25 g，放入装有 225 mL 灭菌 APW 增菌液的均质杯内，于 8000rpm/min~10000rpm/min 均质 1 min~2 min，或以剪刀充分剪碎，制成 1:10 样本匀液。深冻样品、干品、盐渍产品的初始增菌液放置在 37℃ ± 1℃ 培养 6 h ± 1 h，新鲜样品的初始增菌液放置在 41.5℃ ± 1℃ 培养 6 h ± 1 h。如果样品不够 25g，则取全部样品，加入 9xmL 增菌液以获得 10-1 浓度的样品匀液。若上述制备的待检样品不能在当日进行培养，应放置在 2℃~8℃ 保存至次日。为提高检出率，可进行第二次增菌，取 1 ml 培养物接种到 10 ml 的 APW 中，置于 41.5℃ ± 1℃ 培养 18 h ± 1 h（加入样品前，APW 应预先保温至 37℃ ± 1℃）。

详细步骤请按照标准操作。

◆ 实验操作

将试剂完全解冻，各组分离心 30s。

1. 试剂配制（试剂准备区，放置于冰盒中进行）：

若有 N 个待检样品，则参照下表，按照 N+2 个数量计算各组分用量（N 个待检样品+1 个空白对照 NG+1 个阳性对照 PG），涡旋混匀，离心 30 秒，分装于 0.2ml PCR 管中。

试剂	使用量
A-VC-P	20×(N+2)μL
反应液总体积	20×(N+2)μL

2.模板制备（样本制备区）

建议使用病原微生物 DNA/RNA 提取试剂盒等商品化试剂盒，具体过程详见产品说明书。

3. 添加模板（样本制备区，放置于冰盒中进行）

向步骤 1 中已含有混合液的 PCR 管中分别加入 5μl 模板，顺序为空白对照 NG-P、待测样品模板、阳性对照 PG-VC-P，离心 30 秒，立即进行扩增反应。

4. 扩增反应（扩增及产物分析区）

使用荧光定量 PCR 仪，荧光基团选择 FAM，淬灭基团选择 NONE。

按下列条件设置扩增反应：

	PCR 循环			荧光收集位点
	温度	时间	循环数	
去污染	37℃	10 分钟	1 个循环	—
预变性	95℃	1 分钟	1 个循环	—
扩增	95℃	15 秒	40 个循环	—
	60℃	30 秒		※

5.基线和阈值设定

基线调整取 3-15 个循环的荧光信号，阈值线应超过空白对照扩增曲线的最高点。

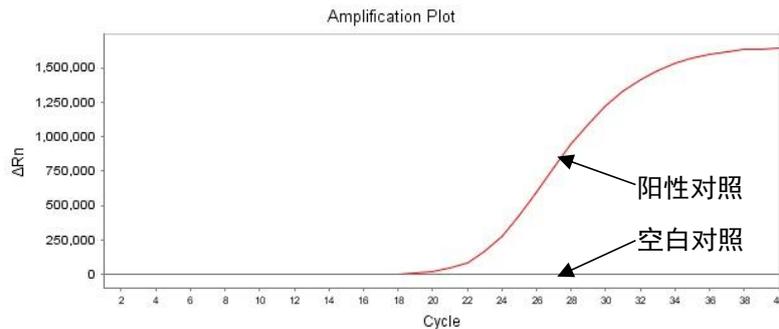
◆ 结果判定

检测样品无 Ct 值或 ≥40，曲线为直线或轻微斜线，无“S”型扩增曲线，可报告样品阴性，不含有霍乱弧菌或含量低于检测限；

检测样品 Ct ≤35，曲线呈“S”型扩增曲线，可直接报告样品阳性，含有霍乱弧菌；

检测样品 35 < Ct < 40，需进行一次重复实验，若 Ct 值 ≥40 则为阴性，否则为阳性。

★ NG 反应为平滑直线，PG 反应为“S”型扩增曲线且 Ct 值 < 30，此次检测结果有效，否则无效。如重复检测结果仍为无效，请与技术支持人员联系。



◆ 企业信息

广州双螺旋基因技术有限公司

网址：www.dhelix.cn

电话：020-85671013

传真：020-34037175

地址：广州国际生物岛螺旋四路 7 号标准产业单元二期第三栋第三层 302 单元