

旋达[®]R1动物疫病检测系列

哈维氏弧菌核酸检测试剂盒（恒温荧光法）

请于-20℃条件下保存，有效期 12个月

◆ 产品说明

旋达[®]R1动物疫病检测系列基于独特的恒温荧光检测技术，可针对食品、动物组织等样品中病原的特异核酸片段进行扩增，通过实时扩增曲线判定结果。本产品用于哈维氏弧菌的检测，**检出限为 10³copies/μl 基因组 DNA。**

◆ 产品组成（48 测试）

031141MIII	
试剂	含量
A-VH-I	22μL× 48 管
B-I	90μL × 1 支
PG-VH-I	50μL × 1 支

◆ 适用仪器

Dhelix-Q5、ESE Tube Scanner、Genie II、Deaou-308C 等恒温荧光检测仪，Gentier 32R、Gentier 48E/48R、CFX 96等荧光 PCR 仪。

◆ 自备耗材和仪器

①灭菌 1.5mL 或 2.0mL 离心管；②冰盒；③移液器（0.1-2.5μL，0.5-10μL，10-100μL，100-1000μL）及配套灭菌吸头；④离心机；⑤涡旋混匀器；⑥金属浴

◆ 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：样本制备区。
 - 2) 第二区：模板添加区。
 - 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。
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

参照下述方法处理样品。

一. 直接检测

1. 病灶组织

(1)若对样本不增菌直接进行检测，则取患病动物的病灶组织做匀浆备用。

2. 水体

1) 取 10~100mL 养殖水，用筛网过滤，取滤液通过 0.22um 的硝酸纤维膜过滤；

2) 将滤膜剪碎振荡重悬于 500 μL 0.9% NaCl 水溶液或无菌生理盐水，12000 rpm 离心 5 min，尽量弃净上清液。

二. 增菌检测

取待检样品 25g (mL)，加入 225mL 的 TYE 液体培养基，用旋转刀片式均质器以 8000r/min 均质 1 min，或者

拍击式均质器拍击 2 min，制备成 1:10 的均匀稀释液。如无均质器，则将样品放入无菌乳钵或均质袋中磨碎，再加入 10mL TYE 液体培养基，于摇床培养 24h。

详细步骤请按照标准操作。

◆ 实验操作

1. 模板制备（样本制备区）

建议使用水生动物病原体基因组DNA/RNA提取试剂盒（FAST）等商品化试剂盒，具体过程详见产品说明书。

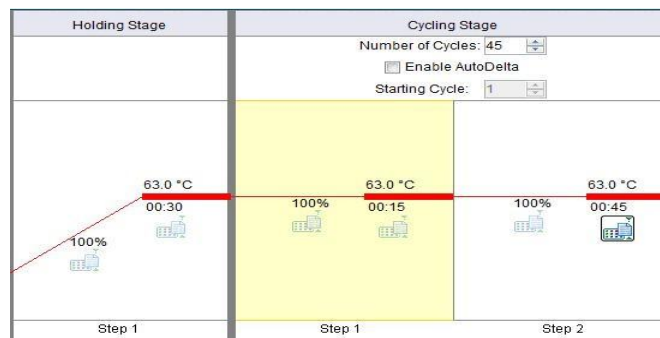
2. 添加模板（模板添加区，放置于冰盒中进行）

取出所需测试数的已含有反应液 A-VH-I 的 PCR 管，将试剂完全解冻，离心 30 秒，在管盖上标记管名（阴性对照管 NG、样品 XX、阳性对照管 PG）。打开管盖向各管管底分别加入 1 μ L B-I，盖上阴性对照管管盖，其他各管分别沿管壁加入 2 μ L 模板，顺序为待测样品模板、PG-VH-I，依次盖好各管管盖，涡旋混匀 30s，离心 1min，立即进行扩增反应。

3. 扩增反应（扩增及产物分析区）

①恒温仪器 63 $^{\circ}$ C 条件下反应 45 min。待仪器升温至 63 $^{\circ}$ C 后，新建程序，设置实验名称及反应时间，将步骤 2 中离心后的 PCR 反应管放入恒温荧光分子检测仪，点击开始检测。

②若使用荧光定量 PCR 仪，则荧光基团选择 FAM，淬灭基团选择 None，将 63 $^{\circ}$ C 15 s，63 $^{\circ}$ C 45 s 作为一个循环，于 63 $^{\circ}$ C 45 s 处收集荧光信号，45 个循环。



若使用其他仪器请参照仪器说明书进行设置。

◆ 结果判定

①恒温仪器自动判定结果，若显示“阳性”或“+”，则样品中含有哈维氏弧菌；若显示“阴性”或“-”，且没有出现 S 型扩增曲线，则样品中不含有哈维氏弧菌或含量低于检测限。

②在荧光定量 PCR 仪上，根据有无“S”型扩增曲线判定结果。若有“S”型扩增曲线，则样品中含有哈维氏弧菌；若无“S”型扩增曲线，则样品中不含有哈维氏弧菌或含量低于检测限。

★ NG 反应管结果显示“阴性”，PG 反应管结果显示“阳性”，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