

旋达[®]R1动物病害检测系列

虾肝肠胞虫（EHP）/致急性肝胰腺坏死病副溶血性弧菌（*Vp_{AHPND}/EMS*）
双重核酸检测试剂盒（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动物病害检测系列可针对动物组织、饲料、粪便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。本产品用于对虾肝肠胞虫（EHP）和致急性肝胰腺坏死病副溶血性弧菌（*Vp_{AHPND}/EMS*）的检测，检出限为 10¹ copies/μL 基因组 DNA。

◆ 产品组成（48 测试）

031282M	
试剂	含量
A-E HP/EMS-P	20μL × 8 管 × 6 排
NG-P	100μL × 2 支
PG-EHP/EMS-P	100μL × 1 支

◆ 适用仪器

Gentier 32R、Gentier 48E/48R、Gentier mini、CFX 96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

- 本试剂检测灵敏度高。为了防止污染，实验要分区操作。
 - 第一区：样本制备区。
 - 第二区：模板添加区。
 - 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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《SC/T 7232-2020 虾肝肠胞虫病诊断规程》、《SC/T 7233-2020 急性肝胰腺坏死病诊断规程》等标准进行样品处理。样品的采集数量、方法和保存运输应符合 GB/T 28630.4 附录 B 的要求。

样品处理：①对虾受精卵、幼体、仔虾取完整个体；幼虾至成虾阶段取去除眼柄的头胸部（肝胰腺、鳃丝、心脏等）、肠组织或粪便。②受精卵、幼体、仔虾或达到 0.5g 样品可以合并样本，个体稍大的虾可取个体进行检验。轮虫、卤虫取完整个体，可以合并样本进行检验。

◆ 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，放置于冰盒上进行）

剪下所需测试数的已含有反应液的 PCR 管，放置在室温待解冻后，离心 30 秒后打开管盖，向每管反应液中分别加入 5 μ L 模板，顺序为 NG、待测样品模板、PG-EHP/EMS-P。盖好管盖后，涡旋混匀 30s，离心 1min，立即进行 PCR 扩增反应。

3. 扩增反应（扩增及产物分析区）

使用荧光定量 PCR 仪，EHP 荧光基团选择 FAM，淬灭基团选择 NONE；EMS 荧光基团选择 VIC，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
去污染	50 $^{\circ}$ C	5 分钟	1 个循环	—
预变性	95 $^{\circ}$ C	5 分钟	1 个循环	—
扩增	95 $^{\circ}$ C	15 秒	45 个循环	—
	60 $^{\circ}$ C	30 秒		※

其他仪器请参照仪器说明书进行设置。

4. 基线和阈值设定

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

◆ 结果判定

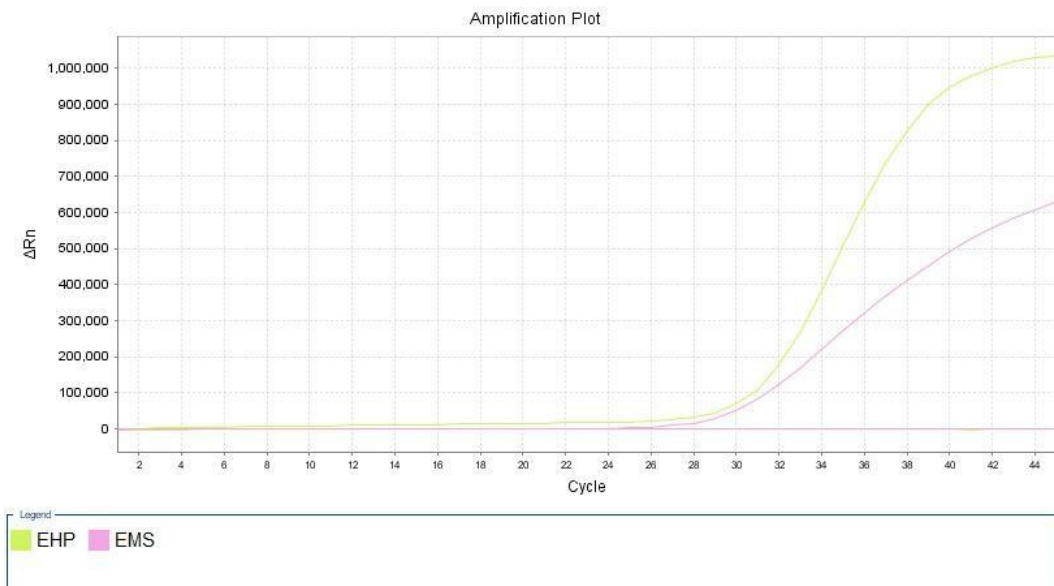
检测样品 Ct 值 \geq 45 或无 Ct 值，曲线为直线或轻微斜线，无“S”型扩增曲线，可报告样品阴性，不含有虾肝肠胞虫（EHP）和致急性肝胰腺坏死病副溶血性弧菌（*Vp*_{AHPND/EMS}）或含量低于检出限；

FAM 通道样品 Ct \leq 40，曲线呈“S”型扩增曲线，可直接报告样品阳性，含有虾肝肠胞虫（EHP）；

VIC 通道样品 Ct \leq 40，曲线呈“S”型扩增曲线，可直接报告样品阳性，含有致急性肝胰腺坏死病副溶血性弧菌（*Vp*_{AHPND/EMS}）；

测试样品检测 Ct 值在 40~45 之间，应调整模板浓度，重做实时荧光 PCR。再次扩增后的样品检测 Ct 值 $<$ 45，则可判定样品含有 EHP/EMS；再次扩增后的样品检测 Ct 值 \geq 45，则可判定该样品不含有 EHP/EMS 或含量低于检出限。

★ NG 反应为平滑直线，PG 反应为“S”型扩增曲线，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。



参考结果图

◆ 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