

旋达[®]R1动物病害检测系列

哈维氏弧菌核酸检测试剂盒（带内参，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、水样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 10¹ copies/μL 基因组 DNA**。

◆ 产品组成（48 测试）

031142RM	
试剂	含量
A-VH/IPC-P	20μL × 8 管 × 6 排
NG-P	100μL × 2 支
PG-VH/IPC-P	100μL × 1 支
IPC-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

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：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)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-VH/IPC-P。盖好管盖后，涡旋混匀 30 秒，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，VH 荧光基团选择 FAM；内参对照（IPC）荧光基团选择 VIC
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

进行软件设置时，为目标基因 VH 和内参对照 IPC 分别设置特定的荧光通道。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

1、质量结果判定

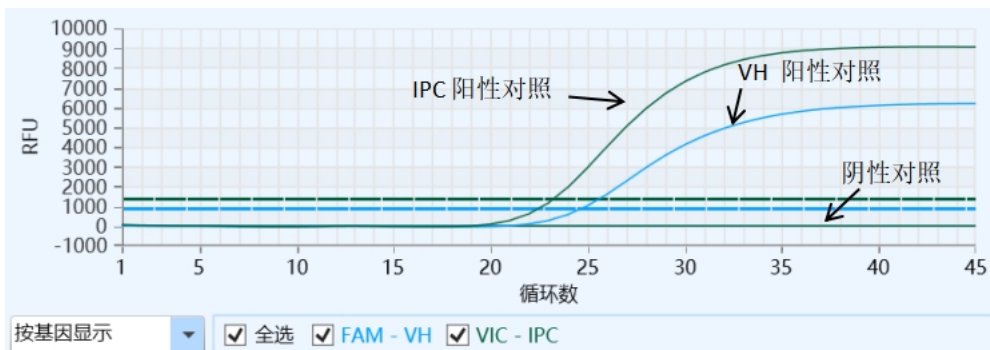
- 1) 阴性对照：VIC 荧光通道 $C_t > 45$ ，FAM 荧光通道 $C_t > 45$ ，无“S”型无扩增曲线
 - 2) 阳性对照：VIC 荧光通道 $C_t \leq 30$ ，FAM 荧光通道 $C_t \leq 30$ ，曲线呈“S”型扩增曲线
- 上述两项若有一项不符合，应重新进行扩增；如重复检测结果仍为无效，请与技术支持人员联系。

2、检测结果判定

① 当检测对虾来源样品，VIC 荧光通道应 $C_t < 45$ ，根据 FAM 荧光通道进行结果判读

- 1) FAM 荧光通道 $C_t < 40$ ，曲线呈“S”型扩增曲线，可报告样品阳性，含有哈维氏弧菌（VH）。
- 2) FAM 荧光通道 $40 < C_t < 45$ ，曲线呈“S”型扩增曲线，判断样品可疑，建议复检；复检后，在阴阳性对照都正常的前提下，样品 FAM 荧光通道 $C_t < 45$ ，可判断样品含有哈维氏弧菌（VH）；样品 FAM 荧光通道 $C_t \geq 45$ ，可判断样品不含有哈维氏弧菌（VH）。
- 3) FAM 荧光通道 $C_t \geq 45$ ，无“S”型扩增曲线，可报告样品阴性，不含有哈维氏弧菌（VH）。如果 VIC 荧光通道 $C_t \geq 45$ ，建议重新提取样品核酸进行复检。

② 当检测非对虾来源样品，可在核酸提取时另加入 10 μ L 的 IPC-P 作为内部对照，按以上规则进行结果判读。



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