

旋达[®]R1 动物病害检测系列

致急性肝胰腺坏死病副溶血性弧菌 (*Vp* AHPND/EMS) 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。本产品用于致急性肝胰腺坏死病副溶血性弧菌 (*Vp* AHPND/EMS) 病原的检测, **检出限为 10¹ copies/μl 基因组 DNA**。

◆ 产品组成 (48 测试)

031272RM	
试剂	含量
A-EMS/IPC-P	20μL × 8 管 × 6 排
NG-P	100μL × 2 支
PG-EMS/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

- 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

参照相关标准处理样品, 制备的样本保存待用。
详细步骤请按照标准操作。

◆ 实验操作

- 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。
- 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 5μL 模板, 顺序为 NG、待测样品模板、PG-EMS/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。
- 扩增反应 (扩增及产物分析区)
使用荧光定量 PCR 仪, EMS 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℃	5 分钟	1 个循环	—
预变性	95℃	5 分钟	1 个循环	—
扩增	95℃	15 秒	45 个循环	—
	60℃	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 EMS 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。

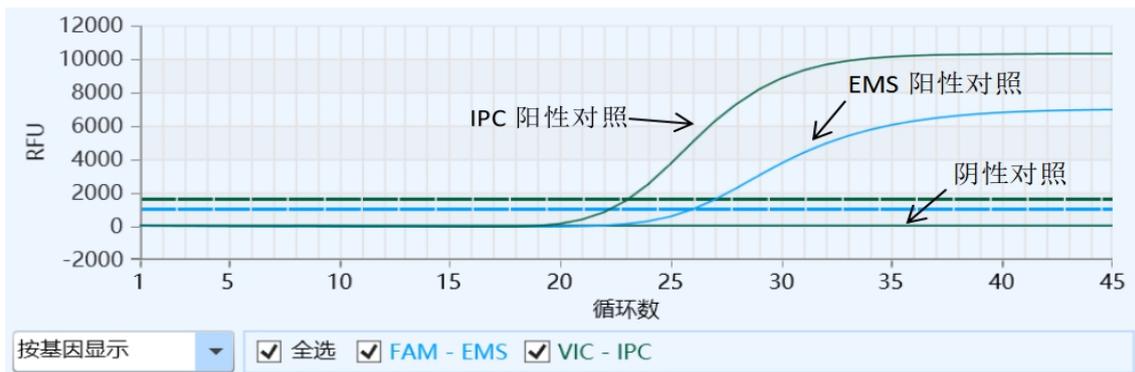
2、检测结果判定

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，含有致急性肝胰腺坏死病副溶血性弧菌 (Vp AHPND/EMS)。
- 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 $C_t < 45$ ，可判断样品含有致急性肝胰腺坏死病副溶血性弧菌 (Vp AHPND/EMS)；样品 FAM 荧光通道 $C_t \geq 45$ ，可判断样品不含有致急性肝胰腺坏死病副溶血性弧菌 (Vp AHPND/EMS)。
- 3) FAM 荧光通道 $C_t \geq 45$ ，无“S”型扩增曲线，可报告样品阴性，不含有致急性肝胰腺坏死病副溶血性弧菌 (Vp AHPND/EMS)。

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