

旋达[®]R1 动物病害检测系列

对虾白斑综合症病毒（WSSV）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。本产品用于对虾白斑综合症病毒（WSSV）的检测，**检出限为 10¹ copies/μL 基因组 DNA**。

◆ 产品组成（48 测试）

031012RM	
试剂	含量
A-WSSV/IPC-P	20μL × 8 管 × 6 排
NG-P	100μL × 2 支
PG-WSSV/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

①样品的采集和制备是对虾白斑综合症病毒检测的重要步骤，为防止交叉污染，应使用一次性消耗品，研钵应经 160℃干烤 2 h，其他不宜干烤或高压处理的器皿应使用 1%次氯酸钠溶液浸泡。②优先采集有症状的或活力差的个体。对于成虾取鳃或上皮、肝胰腺、肠、胃、游泳足或步足等病灶部位，活力差的个体采集 10-20 尾/池，活力好的个体至少多点采集 150 尾/池后混匀再随机抽检 10-20 尾。对于幼虾、仔虾、幼体或受精卵取整体，活力差的个体至少采集 20 尾/池，活力好的虾苗至少采集 150 尾/池。同一批样品，建议多点采集合并后，作为一份样品进行均质，提取 DNA。③采样过程应快速完成，将采取样品放入无菌均质袋中均质成糜状，充分混匀。

详情请参照相关标准进行样品前处理。

◆ 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 5μL 模板，顺序为 NG、待测样品模板、PG-WSSV/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，WSSV 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 WSSV 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 $Ct > 45$ ，FAM 荧光通道 $Ct > 45$ ，无“S”型扩增曲线

2) 阳性对照：VIC 荧光通道 $Ct \leq 30$ ，FAM 荧光通道 $Ct \leq 30$ ，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 $Ct < 45$ ，根据 FAM 荧光通道进行结果判读

1) FAM 荧光通道 $Ct < 40$ ，曲线呈“S”型扩增曲线，可报告样品阳性，含有对虾白斑综合症病毒（WSSV）。

2) FAM 荧光通道 $40 < Ct < 45$ ，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 $Ct < 45$ ，可判断样品含有对虾白斑综合症病毒（WSSV）；样品 FAM 荧光通道 $Ct \geq 45$ ，可判断样品不含有对虾白斑综合症病毒（WSSV）。

3) FAM 荧光通道 $Ct \geq 45$ ，无“S”型扩增曲线，可报告样品阴性，不含有对虾白斑综合症病毒（WSSV）。

如果 VIC 荧光通道 $Ct \geq 45$ ，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 $10\mu\text{L}$ 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