

旋达®R1 致病微生物检测系列

嗜肺军团菌核酸检测试剂盒（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 致病菌检测系列基于独特的恒温荧光检测技术，可针对食品、饲料等样品中的致病微生物的特异核酸片段进行扩增，仪器实时监测扩增过程中的荧光信号变化，自动判读结果。本产品用于嗜肺军团菌的检测。检出限为 10^3 CFU/ml。

◆ 产品组成（48 测试）

012011M	
试剂	含量
A-LS-I	1200 μ L \times 1 支
B-I	55 μ L \times 1 支
C-I	1200 μ L \times 1 支
D-I	1200 μ L \times 4 支
NG-I	50 μ L \times 2 支
PG-LS-I	50 μ L \times 1 支

◆ 适用仪器

Dhelix 1610、Dhelix 3210、ESE Tube Scanner、Genie II、Deaou-308c 等恒温荧光检测仪，ABI 7500、LightCycler480、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灭菌 0.2mL PCR 管或八联管；③冰盒；④移液器（0.5-10 μ L，10-100 μ L，100-1000 μ L）及配套灭菌吸头；⑤离心机；⑥涡旋混匀器；⑦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：试剂准备区。
 - 2) 第二区：样本制备区。
 - 3) 第三区：模板添加区。
 - 4) 第四区：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，并按检测频次将反应液以适当体积分管保存。
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。
7. 检出限为 10^3 CFU/ml 是以 1 ml 10^3 CFU/ml 增菌液离心后收集菌体再提取的细菌基因组 DNA 作为模板。

◆ 样品处理

参照《WS 394-2012 公共场所集中空调通风系统卫生规范》中附录 B，采集集中空调系统冷却水、冷凝水及其形成的沉积物、软泥等样品中的水样并测定嗜肺军团菌。其它洗浴室、温泉水、景观水等样品中的嗜肺军团菌测定

可参照执行。

取灭菌的 500 ml 铁质布氏漏斗及配套的 0.22 μm 无菌滤纸，安装于真空抽滤装置上；取采集的水样，颠倒混匀，将 200 ml 水样倒入漏斗；打开真空泵进行抽滤，富集菌体于 0.22 μm 滤纸上；取出过滤后的滤纸转移到灭菌塑料离心管内，加入 2 ml 无菌水，用移液器反复冲洗并置于振荡器上充分振荡，使过滤物溶于无菌水。

详细步骤请按照标准操作或查阅食安通软件。

◆ 实验操作

将试剂完全解冻，各组分离心 30s。

1. 试剂配制（试剂准备区，放置于冰盒中进行）：

若有 N 个待检样品，则参照下表，按照 N+2 个数量计算各组分用量（N 个待检样品+1 个阴性对照+1 个阳性对照），将反应液置于 0.6ml 或者 1.5ml 离心管中，涡旋混匀，离心 30 秒，分装于 0.2ml PCR 管中，并向每管加入 1 滴 C-I（约 20μl）。

试剂	使用量
A-LS-I	22×(N+2)μL
B-I	1×(N+2)μL
反应液总体积	23×(N+2)μL

2. 模板制备（样本制备区）

- 1) 将菌悬液摇匀稍静止，取菌悬液 1 mL，10000 rpm 离心 3 min，尽量弃净上清液；
- 2) 涡旋混匀 DNA 提取液，向沉淀中加入 100 μL D-I，涡旋混匀，100°C 加热 5 min；
- 3) 10000 rpm 离心 3 min，将上清液转移至新的离心管中备用（2 μL 上清用于核酸扩增）。

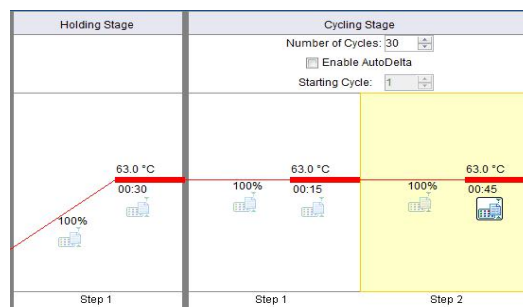
3. 添加模板（模板添加区，放置于冰盒中进行）

在步骤 1 中已含有反应液的 PCR 管中加入 2μL 模板，顺序为 NG-I、待测样品模板、PG-LS-I。涡旋混匀 30s，离心 1min，立即进行扩增反应。

4. 扩增反应（扩增及产物分析区）

① 恒温仪器 63°C 条件下反应 30min。

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°C 15 s，63°C 45 s 作为一个循环，于 63°C 45 s 处收集荧光信号，30 个循环。



其他仪器请参照仪器说明书进行设置。

◆ 结果判定

① 仪器自动判定结果，若显示“阳性”，则样品中含有嗜肺军团菌；若显示“阴性”，则样品中不含有嗜肺军团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，则样品中含有嗜肺军团菌；若无“S”型扩增曲线，则样品中不含有嗜肺军团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