

旋达[®]R1致病微生物检测系列

肠出血性大肠杆菌O104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 致病微生物检测系列基于独特的恒温荧光检测技术，可针对食品、动物产品等样品中致病微生物的特异核酸片段进行扩增，通过实时扩增曲线判定结果。本产品用于对肠出血性大肠杆菌 O104 的检测，**检出限为** 10^3 CFU/ml。

◆ 产品组成（48 测试）

011151M	
试剂	含量
A-O104-I	1200μL × 1 支
B-I	55μL × 1 支
C-I	1200μL × 1 支
PG-O104-I	50μL × 1 支

◆ 适用仪器

Dhelix-Q5、ESE Tube Scanner、Genie II、Deaou-308C 等恒温荧光检测仪，ABI 7500, ABI StepOne, 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冰盒；③移液器（0.1-2.5μL，0.5-10μL，10-100μL，100-1000μL）及配套灭菌吸头；④离心机；⑤涡旋混匀器；⑥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：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《SN/T 3994-2014 动物产品中肠出血性大肠杆菌 O104:H4 检疫技术规范》中的 5.2 处理样品，对样品进行前增菌，制备的菌液保存待用。详细步骤请按照标准操作。

样品采集后应尽快检验，若不能及时检验，可在 2℃~4℃保存 18h。以无菌操作取检样 25g（ml）加入到含有 225ml BPW 的无菌均质袋中，在拍击式均质器上连续均质 1min~2min；或放入盛有 225ml BPW 的无菌均质杯中，8000 rpm/min~10000 rpm/min 均质 1min~2min。无菌操作将样品转至 500mL 锥形瓶中，如使用均质袋，可直接进行培养，于 36℃±1℃培养 18h~24h。

◆ 实验操作

将试剂完全解冻，各组分离心 30 秒。

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），将混合液置于 0.6 mL 或者 1.5 mL 离心管中，涡旋混匀，离心 30 秒，分装于 0.2 mL PCR 管中，并向每管加入 1 滴 C-I（约 20 μ L）。

试剂	使用量
A-O104-I	22 $\times$ (N+2) μ L
B-I	1 $\times$ (N+2) μ L
混合液总体积	23 $\times$ (N+2) μ L

2. 模板制备（样本制备区）

建议使用试剂配套细菌组 DNA 提取系列产品，具体过程详见产品说明书。

3. 添加模板（样本制备区，放置于冰盒中进行）

向步骤 1 中已含有混合液的 PCR 管中分别加入 2 μ L 模板，顺序为待测样品模板、阳性对照 PG-O104-I（阴性对照管无需额外加入模板），离心 30 秒，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 $^{\circ}$ C 条件下反应 45 min。待仪器升温至 63 $^{\circ}$ C 后，新建程序，设置实验名称及反应时间，将步骤 3 中离心后的 PCR 反应管放入恒温荧光分子检测仪，点击开始检测。

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 $^{\circ}$ C 15 s，63 $^{\circ}$ C 45 s 作为一个循环，于 63 $^{\circ}$ C 45 s 处收集荧光信号，45 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”或“+”，则样品中含有肠出血性大肠杆菌 O104；若显示“阴性”或“-”，且没有出现 S 型扩增曲线，则样品中不含有对肠出血性大肠杆菌 O104 或含量低于检出限。

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，则样品中含有肠出血性大肠杆菌 O104；若无“S”型扩增曲线，则样品中不含有肠出血性大肠杆菌 O104 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