

旋达®R1 致病微生物检测系列

霍乱弧菌核酸检测试剂盒（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、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。本产品用于霍乱弧菌的检测。检出限为 10^3 CFU/ml。

◆ 产品组成（48 测试）

011081M	
试剂	含量
A-VC-I	1200 μ L × 1 支
B-I	55 μ L × 1 支
C-I	1200 μ L × 1 支
PG-VC-I	50 μ L × 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

- 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：试剂准备区。
 - 第二区：样本制备区。
 - 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，并按检测频次将反应液以适当体积分管保存。
- 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。
- 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 1022-2010 进出口食品中霍乱弧菌检验方法》中的 7.1 和 7.2 处理样品，对样品进行前增菌，制备的菌液保存待用。

以无菌操作取检样 25 g，放入装有 225 mL 灭菌 APW 增菌液的均质杯内，于 8000rpm/min~10000rpm/min 均质 1 min~2 min，或以剪刀充分剪碎，制成 1:10 样本匀液。深冻样品、干品、盐渍产品的初始增菌液放置在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h \pm 1 h，新鲜样品的初始增菌液放置在 $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h \pm 1 h。如果样品不够 25g，则取全部样品，加入 9xmL 增菌液以获得 10-1 浓度的样品匀液。若上述制备的待检样品不能在当日进行培养，应放置在 2°C ~ 8°C 保存至次日。为提高检出率，可进行第二次增菌，取 1 ml 培养物接种到 10 ml 的 APW 中，置于 $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h \pm 1 h（加入样品前，APW 应预先保温至 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ）。

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 20 μ l）。

试剂	使用量
A-VC-I	22 \times (N+2) μ L
B-I	1 \times (N+2) μ L
反应液总体积	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-VC-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 45min。

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”，则样品中含有霍乱弧菌；若显示“阴性”，则样品中不含有霍乱弧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，则样品中含有霍乱弧菌；若无“S”型扩增曲线，则样品中不含有霍乱弧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