

旋达[®]R1 致病微生物检测系列

贝类 A 群轮状病毒 RNA 核酸检测试剂盒 (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贝类 A 群轮状病毒 RNA 核酸检测试剂盒 (PCR 荧光探针法) 可针对贝类样品中 A 群轮状病毒的特异核酸片段进行扩增, 通过实时扩增曲线判定结果。本产品用于贝类样品中 A 群轮状病毒的检测。**检出限为 10² copies/μL。**

◆ 产品组成 (48 测试)

012222M	
试剂	含量
A-RA-P	1000μL × 1 支
NG-P	100μL × 2 支
PG-RA-P	100μL × 1 支

◆ 适用仪器

ABI 7500、CFX 96、Mx 3005P、LineGene9600 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: 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。

◆ 样品处理

请参照《SN/T 2520-2010 贝类中 A 群轮状病毒检测方法 普通 PCR 和实时荧光 PCR 方法》进行; 详细步骤请按照标准操作。首先用灭菌蒸馏水将贝壳表面的污泥清洗干净, 打开贝壳后, 倒掉腔内的液体, 使用灭菌消毒的剪刀和镊子取贝类消化腺组织 5 g。在 5 g 消化腺组织中加入 35 mL 匀浆缓冲液 (磷酸缓氢二钠缓冲液, pH 9.6), 匀浆器充分匀浆 150 s; 将匀浆液置于 37 °C 空气浴振荡摇床中, 200 r/min 振荡 30 min; 4 °C, 10000g, 离心 10 min。取 1 mL 上清液转移到 2 mL 离心管中, 加入 0.14 mL 16% PEG8000 溶液 (PEG 终浓度为 2%), 颠倒 5 次混匀。冰上放置 1h, 4°C, 10000g, 离心 10min, 弃上清, 保留沉淀。

◆ 实验操作

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 个数量计算反应液用量 (N 个待检样品+1 个空白对照+1 个阳性对照), 涡旋混匀, 离心 30s, 分装于 0.2mL PCR 管中。

试剂	使用量
A-RA-P	20×(N+2)μL
反应液总体积	20×(N+2)μL

2. 模板制备（样本制备区）

建议使用病毒基因组 DNA /RNA 提取试剂盒等商业化试剂盒，具体过程详见产品说明书。

3. 添加模板（样本制备区，放置于冰盒上进行）

在步骤 1 中已含有反应液的 PCR 管中分别加入 5μL 模板，顺序为 NG、待测样品模板、PG-RA-P。盖好配套的 PCR 管盖后，涡旋混匀 30s，离心 1min，立即进行 PCR 扩增反应。

4. 扩增反应（扩增及产物分析区）

使用荧光定量 PCR 仪，荧光基团选择 FAM，淬灭基团选择 NONE。

按下列条件设置扩增反应：

PCR 循环			荧光收集位点
50℃	15 分钟	1 个循环	—
95℃	2 分钟	1 个循环	—
95℃	15 秒	40 个循环	—
60℃	30 秒		※

5. 基线和阈值设定

基线调整取 3-15 个循环的荧光信号，阈值线应超过空白对照扩增曲线的最高点。

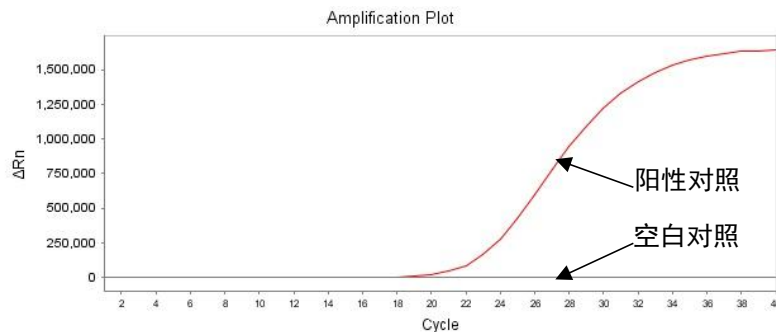
◆ 结果判定

检测样品 $Ct \geq 40.0$ ，曲线为直线或轻微斜线，无“S”型扩增曲线，可报告样品阴性，不含有轮状病毒或含量低于检测限；

检测样品 $Ct \leq 35.0$ ，曲线呈“S”型扩增曲线，可直接报告样品阳性，含有轮状病毒；

检测样品 $35.0 < Ct < 40.0$ ，需进行一次重复实验，若 Ct 值 ≥ 40.0 则为阴性，否则为阳性。

★ NG 反应为平滑直线，PG 反应为“S”型扩增曲线且 Ct 值 < 30 ，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