

旋达[®]R1 动物疫病检测系列

鸡新城疫病毒（NDV）^{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 本产品可针对鸡及其加工产品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。

本产品用于对鸡新城疫病毒（NDV）的检测，**检出限为 10¹ copies/μL。**

◆ 产品组成（48 测试）

036142M	
试剂	含量
A-NDV-P	20μL × 8 管 × 6 排
NG-P	100μL × 2 支
PG-NDV-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

- 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：样本制备区。
 - 第二区：模板添加区。
 - 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。
- 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。

◆ 样品处理

对于急性死亡的家禽，应采集咽鼻拭子、肺、肾、肠（包括内含物）、盲肠扁桃体、脾脏、大脑、肝脏和心脏组织样本。活家禽的样本应包括气管或口咽拭子和泄殖腔拭子，后者应明显带有粪便。拭子取样可能会伤害小型、脆弱的家禽，因此收集新鲜粪便是一种适当的选择。样品应置于 pH 7.0-7.4 的无菌等渗磷酸缓冲液（PBS）中。使用含有蛋白质的培养基（例如：脑心浸液培养基（BHI）），可以增加病毒的稳定性，尤其是在运输过程中。样品必须放置在冷运输介质中。样品到达实验室后，如果不能及时处理，应将其储存在-70℃。用无菌的研杵和研钵研磨 0.5~1.0 g 的组织块，然后加入 5~10 mL 缓冲盐溶液，制备组织悬浮液。或者，可以将组织块放置在含有缓冲液或培养基和无菌珠或碎片的试管中，然后使用匀浆器进行匀浆来制备样本。通过 1000g 离心 5 分钟获得上清液，用于病毒分离和提取。

◆ **实验操作**

1. 模板制备（样本制备区）

使用合适的商品化核酸提取试剂盒，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 秒后揭开管盖，向每管反应液中分别加入 5 μ L 模板，顺序为 NG、待测样品模板、PG-NDV-P。盖好 PCR 管盖后，涡旋混匀 30s，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，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°C	5 分钟	1 个循环	—
95°C	5 分钟	1 个循环	—
95°C	15 秒	40 个循环	—
60°C	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

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**

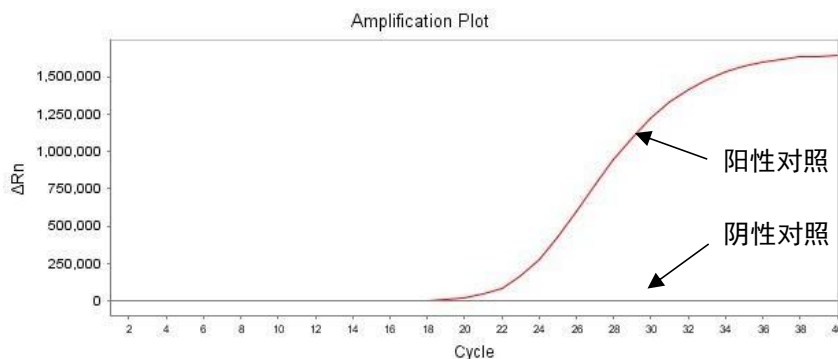
在阳性对照 Ct 值小于 30.0 并且出现典型的扩增曲线，阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线的条件下（若不满足该两项条件，此次检测无效，应重做荧光 PCR 扩增）：

测试样品检测 Ct 值等于 40, 曲线为直线或轻微斜线, 无“S”型扩增曲线, 可判定样品不含有鸡新城疫病毒(NDV) 或含量低于检出限；

测试样品检测 Ct 值小于或等于 35, 曲线呈“S”型扩增曲线, 可判定样品含有鸡新城疫病毒（NDV）；

测试样品检测 Ct 值大于 35 小于 40, 应调整模板浓度, 重做实时荧光 PCR。再次扩增后的样品检测 Ct 值大于 35 小于 40, 则可判定样品含有鸡新城疫病毒（NDV）；再次扩增后的样品检测 Ct 值等于 40, 则可判定该样品不含有鸡新城疫病毒（NDV）或含量低于检出限。

★ NG 反应为平滑直线, PG 反应为“S”型扩增曲线, 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。



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