

水生动物霍乱弧菌实时荧光 PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of *Vibrio cholerae*
(50 reactions)

1、试剂盒简介

货号：HB-817-1

为了适应霍乱弧菌检测的需要，本公司依据 SN/T5125-2019《水生动物副溶血弧菌和霍乱弧菌双重实时荧光 PCR 方法》中规定的实时荧光 PCR 检测保守序列的引物探针及其循环参数等技术标准，在本公司严谨的产品质量保证体系管控下生产和质检。确保本试剂盒满足标准中的检测标准要求。本试剂盒具有快速灵敏、特异、准确、安全、操作简单、应用广泛等特点及优点。

2、试剂盒组成

试剂盒核酸扩增试剂，具体组成参见表 1：

表 1：试剂盒组成 (50test/盒)

组成成分	体积
核酸扩增试剂：DEPC 水	5ml × 1 管
霍乱弧菌荧光 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
霍乱弧菌荧光阳性对照	1ml × 1 管

3、样本采集，存放及运输

3.1 样本采集：所用取样器材必须经高压灭菌并烘干。

应按 SN/T5125-2019 的规定制备样品。

3.2 存放：研磨后的样本在 2℃—8℃ 条件下保存应不超过 24 h；-70℃ 以下可长期保存，但应避免反复冻融（最多冻融 3 次）。

3.3 运输：采用冰壶或泡沫箱加冰密封进行运输。

4、检测步骤

4.1 DNA 核酸提取操作方法(在样本处理区进行)：

4.1.1 取 n 个 1.5ml 灭菌 Eppendorf 管，其中 n 为待检样品数和一管阴性对照之和，对每个管进行编号标记。(注：试剂盒中的阳性对照直接作为 PCR 检测的模板，无需提取核酸)

4.1.2 每管加入 100 μl DNA 提取液 1，然后分别加入待测样本和阴性对照各 100μl，一份样本换一个吸头；混匀器上震荡混匀 5 s，于 4℃~25℃ 条件下，12 000 r/min 离心 10 min。

4.1.3 尽可能吸弃上清且不碰沉淀，再加入 10μl DNA 提取液 2，混匀器上震荡混匀 5s，于 4℃~25℃ 条件下，2 000 r/min 离心 10 s。

4.1.4 100℃ 干浴或沸水浴 10 min；加入 90μl DEPC 水，12 000 r/min 离心 10 min，吸取上清，即为提取的 DNA，冰上保存待用（提取的 DNA 需在 2 h 内进行 PCR 扩增或放置于 -70℃ 冰箱内保存）。（也可采用其他等效的商品化的 DNA 核酸提取试剂。）

4.2 荧光 PCR 检测

公司地址：北京市顺义区南法信顺畅大道 14 号院东亚首航国际 1 号楼 3 层 329 室

公司网址：www.halcyonbio.com

邮 箱：haisentong@126.com

电话：010-50933811, 13718421576, 17718526815

客服 QQ：737481857 835171324

4.2.1 扩增试剂准备（在反应混合物配制区进行）：

从试剂盒中取出相应的 NHP 荧光 PCR 反应液、Taq 酶，2000×g 离心 5 秒钟。每个样品测试反应体系配制见下表 2。

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	荧光 PCR 反应液	Taq 酶	合计
用量	14.5 μL	0.5 μL	15 μL

4.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个荧光 PCR 管孔中各分装 15 μL 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 10 μL，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。

4.2.3 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：

第一阶段，95°C/1 min；

第二阶段，95°C/15 sec，60°C/34 sec 40 个循环；在第二阶段每次循环 60°C 退火延伸时收集荧光。试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

5 结果判定

5.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

5.2 质控标准

阴性对照无 Ct 值或无扩增曲线。

阳性对照的 Ct 值应 <28.0，并出现典型的扩增曲线。否则，此次实验视为无效。

5.3 结果描述及判定

阴性：无 Ct 值或无典型扩增曲线，示样品中无霍乱弧菌核酸。

阳性：Ct 值 ≤30，且出现典型的扩增曲线，FAM 标记的探针示样品中存在霍乱弧菌核酸；。

5.4 有效原则：Ct 值 >30 的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性，否则为阳性。