

急性肝胰腺坏死病病原（AHPND/EMS）核酸测试剂盒  
使用说明书  
（产品货号：KW109）

试剂盒标配材料

组分		24T	96T
溶解剂	DA（白盖）	1.2mL	1.2mL*2
激活剂	MC（绿盖）	250μl	250μl
阳性质控	（红盖）	80μl	80μl
荧光检测试剂	（铝箔袋）	24T*1	24T*4
使用说明书		1份	1份

检测下限

本试剂盒最低检测下限为100-1000copies/测试

存储条件及有效期

存储在-20±5℃、干燥、避光的环境，有效期1年。

详细实验方案（反应体系为 50μl）

1. 按照以下所述制备每份样本的预混液：

组分	每管加样量/μl
溶解剂 <sup>[1]</sup>	20
模板DNA	2≤x≤10
ddH <sub>2</sub> O	28-x
体积	48

充分振荡混匀并短暂离心。

- 对于每份样本，将48μl预混液转移至每管荧光检测试剂<sup>[2]</sup>中。振荡混匀<sup>[3]</sup>直到扩增试剂重悬，并短暂离心。
- 对于每份样本，在反应管盖上加上2μl激活剂<sup>[4]</sup>，小心盖紧管盖，通过短暂离心使激活剂进入预混液中。短暂振荡混匀<sup>[5]</sup>并再次快速离心。
- 将反应管放入恒温仪（40℃）中，启动检测，持续20分钟，每30秒采集一次FAM通道荧光值。
- 反应结束后，保存数据并弃置样本管。

操作注意要点：

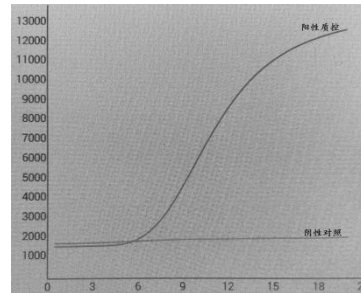
- [1] 溶解剂需完全融化混匀，否则会对实验产生影响。
- [2] 荧光扩增试剂在使用前放置室温平衡10min，剩余未用尽的试剂应注意防潮密封保存。
- [3] 此处振荡混匀旨在将扩增试剂重悬，使体系分散均匀，混匀时间应在3-5s，3000rpm。
- [4] ERA反应是靠激活剂来启动，一旦加入激活剂，务必立即上机孵育。
- [5] 此处振荡混匀时间应在3s左右，时间过长会导致检出时间延后。

## 阳性对照反应

本核酸检测试剂盒包括阳性质控（浓度： $10^5$ cp/μl），可用于检测试剂盒各组分的活性。检测方法与上述实验方案相同，反应温度推荐使用40℃。本荧光检测试剂中含探针，并带有荧光素（FAM）标记物，最佳激发波长为492nm，最大发射波长为520nm。

注：如使用ABI系列PCR仪，请务必于passive reference和quencher处均选择“none”。

组分	每管加样量/μl
溶解剂	20
ddH <sub>2</sub> O	26
阳性质控	2
激活剂	2
体积	50



\*阳性质控、阴性对照实时荧光曲线如上示例图（具体以实际曲线为准），所用仪器为先达 GS8 荧光恒温扩增仪。

## 结果判定

检测结果曲线为直线或轻微斜线，无“S”型扩增曲线，可报告样品阴性，不含有检测项目核酸成分或含量低于检测限；检测结果曲线呈“S”型扩增曲线，可直接报告样品阳性，含有检测项目核酸成分；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。

## 注意事项

1. 本试剂盒仅用于非医用检测；应存储于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、干燥、避光的环境。
2. 推荐使用先达基因核酸释放剂（目录号：NR201）：取芝麻大小动物组织（约15mg），加入到150μl核酸释放剂中，振荡混匀，95℃水浴2min后轻微振荡混匀，快速离心以备下用。或采用DNA抽提试剂盒等方式提取核酸。
3. ERA扩增产物的气溶胶易造成假阳性，为避免交叉污染，试剂配制区与扩增分析区应分隔开。
4. 实验时应设置不加模板的空白对照，以确认是否有待扩增核酸的污染。
5. 在不同的核酸提取方法下，所提取的样本DNA含量和纯度会有差异，可能会导致出现扩增效率不一的现象（详情请查阅PCR抑制剂：乙醇、苯酚、血红素等等）。
6. 阳性质控建议添加2μl，待检样本添加量范围为2μl~10μl。如果待检样本浓度较高，则仅需添加2μl，反之，则加大样本添加量，最大体积不超过10μl。
7. 如果模板DNA拷贝数低，请在反应4分钟后取出反应管，振荡混匀并短暂离心，再放回恒温仪中。
8. 任何能激发和检测所选荧光团，并能将温度稳定于40℃的荧光检测仪都适用于荧光探针检测（GS8荧光恒温扩增仪，ABI 7500，LightCycler480，CFX 96等荧光定量PCR仪）。
9. 扫码关注公众号，输入“问题解答”获取操作视频及常见问题解决方案。



欢迎扫码关注