

# 急性肝胰腺坏死病（AHPND/EMS）病原核酸检测试剂盒（PCR 荧光探针法）使用说明书

（使用前请详细阅读本说明书）

## 【产品名称】

通用名称：急性肝胰腺坏死病（AHPND/EMS）病原核酸检测试剂盒

英文名称：PCR Detection Kit for Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease or Early Mortality Syndrome (EMS) Pathogen (Fluorescent Probe Assays)

【包装规格】48 测试/盒

【产品编号】FZ003AF2

## 【产品简介】

本试剂盒适用于急性肝胰腺坏死病（AHPND/EMS）病原的检测。

## 【检测原理】

基于 Real Time PCR 技术，利用针对 AHPND/EMS 病原检测的特异性基因 PirA，合成相应的引物和荧光探针，加入其他反应所需试剂以及待检核酸样品，即可进行扩增反应。在发生扩增过程中，荧光探针与目的基因片段结合，可被 Taq 酶分解并产生荧光信号，此时荧光定量 PCR 仪可识别该荧光信号，同时根据其强弱变化绘制出相应的实时扩增曲线，进而判定 AHPND/EMS 病原是否检出。

## 【产品组分】

| 组分名称 | 规格×数量      |
|------|------------|
| 裂解液  | 1 mL×2 管   |
| 阳性对照 | 200 μL×1 管 |
| 阴性对照 | 200 μL×1 管 |
| 预混液  | 1 mL×1 管   |
| 说明书  | 1 份        |

## 【储存条件与保质期】

-20℃储存，有效期为 9 个月，避免反复冻融。

## 【灵敏度】

最低检验限：10-100 Copies/Test

## 【所需其他材料和适用仪器】

荧光定量 PCR 仪（具有能够检测 FAM 标记的荧光通道）、高速离心机、

移液器、移液枪头及离心管等。

## 【使用指南】

### 1. 样品前处理

取适量（如 50~100 mg）待检新鲜样品组织研磨，并加入 1~5 倍体积的生理盐水进行匀浆，取 200 μL 匀浆液经商品化病毒 DNA 提取试剂盒提取获得相应的 DNA 待检样品，可于 -20℃ 条件下暂存、待用。

### 2. 加样、反应

从试剂盒中取出预混液，充分融化，涡旋后短暂离心，分别进行如下操作。

- 按照需求取 n 个 PCR 反应管（n=1 管阴性对照+待检样品数+1 管阳性对照），以上每管中分别加入 20 μL 预混液，待用。
- 向上述 n 个反应管中分别加入阴性对照、DNA 待检样品、阳性对照各 5 μL，盖紧管盖，短暂离心，立即进行 PCR 扩增反应。
- PCR 反应体系为 25 μL，设置 FAM 检测通道读取，在反应阶段 2 中 60℃时收集荧光信号，具体程序如下：

| 反应阶段 | 温度  | 时间     | 信号收集 | 循环数 |
|------|-----|--------|------|-----|
| 1    | 95℃ | 30 sec |      | 1   |
| 2    | 95℃ | 5 sec  |      | 40  |
|      | 60℃ | 30 sec | √    |     |

注：对于 ABI 系列荧光定量 PCR 仪器，其反应体系中无需添加 ROX，且在软件设置时，在“Passive Reference”和“Quencher”处均选择“None”。

### 3. 结果

一般情况下，可通过软件自动设定的基线、阈值等直接读取检测

结果。如需调整,可根据所使用仪器的自身情况(如噪声等)以及选取的不同荧光通道进行调整。

### 1) 质量控制:

阴性对照未出现明显的 S 型扩增曲线或 Ct 值 > 37, 阳性对照出现 S 型扩增曲线且其 Ct 值 < 30。若阴阳性对照未同时满足上述条件,则本次检测结果无效,应重新检测或与产品技术支持联系。

### 2) 结果判读:

- ① 无 Ct 值,且未出现典型的 S 型扩增曲线,为阴性结果,判定为 AHPND/EMS 未检出;
- ② Ct 值 ≤ 37,且出现典型的 S 型扩增曲线,为阳性结果,判定为 AHPND/EMS 检出;
- ③ Ct 值 > 37,且出现典型的 S 型扩增曲线,建议重新检测,若重检后 Ct 值 ≤ 37,且出现典型的 S 型扩增曲线,则判定为阳性结果,反之则为阴性结果。

### 【注意事项】

1. 实验操作应按照国家有关临床基因扩增实验室管理规范执行,实验过程应至少分为三个区(样品处理区、反应混合物配制区、核酸扩增区),各区物品为专用,不得交叉使用,避免污染。
2. 使用本试剂盒前请仔细阅读本说明书全文,检测过程中建议穿洁净工作服,戴一次性手套,使用的移液枪头需提前灭菌。

3. 试剂盒中试剂使用前需充分融化、混匀,短暂离心后使用,期间需尽量避免产生气泡,加样完毕后检查反应管是否盖紧,避免泄露造成污染。
4. 待检测样品基因变异可能会造成假阴性结果;待检测样品交叉污染、实验室环境污染以及试剂污染均会造成假阳性结果。
5. 不同批号的产品请勿混合使用,请在产品有效期内使用试剂盒,由于操作不当引起的误判,以及由此误判引发的其他事项,本公司概不负责。
6. 检测完毕后,根据相关规定正确处理废弃耗材以及扩增产物。

### 【生产企业】

企业名称: 广东环凯生物科技有限公司

生产地址: 肇庆高新技术产业开发区科技大街中 13 号

邮政编码: 526238

技术热线: 020-32078333-8877

企业网址: <http://www.bhkbio.com>

E-mail: [Webmaster@huankai.com](mailto:Webmaster@huankai.com)

### 【说明书修改时间】

2020 年 9 月 22 日