



副溶血性弧菌toxR/tdh双重实时荧光PCR检测试剂盒说明书

【产品名称】

通用名称：副溶血性弧菌toxR/tdh双重实时荧光PCR检测试剂盒

英文名称：*Vibrio parahaemolyticus* toxR/tdh dual Real-time PCR Diagnostic kit

【产品货号】MX-2201

【包装规格】24次反应/盒

【运输及保存】

1. 运输：常温或冷藏运输
2. 保存：2°C-8°C冷藏保存（长期不用时建议-20°C保存）
3. 有效期：24个月

【用途】

本试剂盒用于toxR、tdh两重副溶血性弧菌核酸的体外检测，实验结果仅为基础研究提供参考，不作为临床诊断依据。

【检验原理】

本试剂盒采用两重荧光PCR技术，适用于副溶血性弧菌特异性基因toxR和毒理基因tdh核酸的体外检测。每个反应体系均含有副溶血性弧菌种属鉴定和毒力基因检测的两对特异性引物、探针，根据荧光PCR扩增产物的CT值来判定菌株是否为副溶血性弧菌并根据毒力基因确定其是否致病。

【试剂盒内容】

序号	产品组成	规格
1	荧光PCR冻干粉	24次反应/管
2	RNase-Free ddH ₂ O	1mL/管×1
3	裂解液	5mL/瓶×1
4	空白PCR管	8管/排×3

【操作步骤】

1. 样本制备：

按照本说明书进行制备，方法如下：

a) 增菌液检测：取增菌液1mL于1.5mL离心管中，3000×g离心10min或10000×g离心2min，弃去上清，加入200μL裂解液，涡旋混匀，金属浴99°C或沸水浴裂解10min，冰浴冷却后12000×g离心2min，取上清即为模板。

b) 菌落检测：用接种环取一环菌落，溶于200μL裂解液中，涡旋混匀，金属浴99°C或沸水浴裂解10min，冰浴冷却后12000×g离心2min，取上清即为模板。

2. 反应体系配制

①从试剂盒中取出PCR冻干粉，每管加入RNase-Free ddH₂O 575 μL，震荡混匀。（如一次用量较少，可分装到离心管中-20°C保存）



- ②取步骤 2 ①中的23 μL 反应体系加入到 PCR 管中。
③取步骤【样本制备】中提取的2 μL DNA样品加入到 PCR 管中，总反应体积为25 μL 。
④阳性对照、阴性对照和空白对照体系分别加入相应的阳性对照、阴性对照和RNase-Free ddH₂O 2 μL 。全部试剂及模板加样完成后快速离心，使整个体系均在 PCR 管底部。

3. 荧光定量PCR反应条件:

阶段	循环数	温度	时间	步骤	荧光信号 [#] 采集
预变性	1	95°C	5 min	预变性	否
Real-time PCR	40	95°C	5 sec	变性	否
		60°C	30-60 sec*	退火	是

*: 使用不同型号仪器进行时间设定时，请按照仪器使用说明书要求进行实验操作，一般设定在30 sec。

[#]: 副溶血性弧菌特异性基因*toxR*荧光标记为FAM、毒理基因*tdh*荧光标记为VIC，淬灭基团均为TAMRA。

【结果分析与判定】

空白对照：无FAM、VIC荧光信号检出，未出现典型的扩增曲线。

阴性对照：无FAM、VIC荧光信号检出，未出现典型的扩增曲线。

阳性对照（含致病基因）：有FAM、VIC荧光信号检出，出现典型的扩增曲线，Ct值<30.0。

以上需同时满足，否则本次实验无效。

样品检测结果：

Ct值 \geq 35，判定结果为阴性；

Ct值<30，并出现典型的扩增曲线，判断样品为阳性；

30 \leq Ct值<35，并且出现典型的扩增曲线，则重新提取DNA检测。再次检测结果仍为30 \leq Ct值<35，则判定样品为阳性；Ct值 \geq 35，判定结果为阴性。

【检测方法的局限性】

本试剂盒检测的靶序列为副溶血性弧菌基因的保守区域，这些基因高度保守稳定。如果细菌在靶序列处发生基因突变，则可能出现假阴性结果，即发生漏检；同时，样品收集、处理、运送和保存的质量均会对检测结果造成影响。

【注意事项】

- 1.实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按操作步骤执行。
- 2.试剂盒内各组分在使用前应充分融化混匀并经高速短暂离心后使用。
- 3.试剂盒必须避光保存，所使用的离心管、Tip 头应高压灭菌，且不含DNase和RNase。整个操作过程和 PCR 实验室的软硬件设施应符合卫计委颁发《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》、《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》等法规的要求。并恰当处理试验过程中产生的废物和扩增产物，防止交叉污染。
- 4.本产品仅适用于实验室的工业、科研目的，不用于临床诊断或治疗。