

水产养殖病害检测系列试剂盒 Q&A:

1、肝胰腺坏死是哪种病原体导致的？华峰公司的 EMS 检测试剂盒是检测的哪种病原体？

答：肝胰腺是对虾的重要器官，有多种不同病因可以引起肝胰腺坏死，具体病因要根据具体情况判断。急性肝胰腺坏死综合症/病（英文缩写 AHPNS/AHPND，又名“早死病”（英文缩写 EMS）或“偷死病”）是近几年爆发频繁的一种对虾肝胰腺疾病，据报道 AHPND 或 EMS 是由一种能产生名为 Pir 毒素的弧菌导致的，我公司的 EMS 检测试剂盒既是检测能产生 Pir 毒素的 pirA 基因的试剂盒。

2、样品为泥沙，取样多少合适？

答：泥沙对核酸提取的干扰非常大，且一般情况下泥沙中病原体含量较低，要从泥沙中提取足量的病原体核酸难度非常大，目前正在研发针对泥沙样本进行核酸提取的试剂盒。

3、样品为养殖水可以检测吗？

答：水中病原体含量极低，常规采样方法很难检出，具体哪些样品或哪些病原体类型可以检测，由样品和病原体类型或其它性质决定。净化的水或海水可以通过微孔滤膜在蠕动泵作用下抽压过滤，浓缩富集其中的细菌类或寄生虫类病原体（例如 EHP、EMS 等），然后对微孔滤膜进行核酸提取并进行 qPCR 检测，实现对水中极微量细菌类或寄生虫类病原体的检测。普通养殖水由于富含藻类、虾粪便、饲料残渣等，使用微孔滤膜过滤时容易发生堵塞，很难起到浓缩富集效果，目前还没有很好的浓缩富集方法。

4、细菌&弧菌(BNV)核酸检测试剂盒需要做阴阳对照吗？

答：不管是哪种试剂盒，我们都建议做阴阳对照。

5、把复溶液那些试剂放在冰箱里边保存可以吗，会不会对实验有影响？

答：不会，下次使用前需要室温解冻一下，不过冷藏可能会有沉淀产生，建议还是按照说明书，室温储存就行。另外复溶后的阳性对照管需要放在-20℃保存；未拆封的离心柱可以室温阴凉处保存，冷藏储存效果更佳；已拆封的离心柱于一定要冷藏，在 2~8℃中储存。

6、忘了上机前离心了，实验已经开始了，能不能停下来上离心机？

答：不可以。

7、冻干阳性对照是不是加入 50ul 超纯水复溶里面白色固体？

答：是的，复溶后的阳性对照管需要放在-20℃保存。

8、华峰公司目前有检测哪些弧菌的试剂盒？

答：目前有哈维氏弧菌、副溶血弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌，我们也可以根据客户需求定制，大概需要两周时间。

9、细菌&弧菌(BNV)核酸检测试剂盒里面的弧菌是包含了哪些弧菌？

答：鳃弧菌、创伤弧菌、哈维氏、霍乱、溶藻、副溶血、拟态、美人、病深海鱼、杀鲑、杀对虾、灿烂、鱼肠道、费氏、坎贝氏。这些常见的弧菌都可以检，河流弧菌除外。

10、取样过多过少有什么影响吗？

答：取样过多，可能会导致裂解不充分，也有可能导致提取到的核酸过多抑制 PCR 反应；取样过少就有可能提取到的病原体核酸过少，低于检测极限检测不出来。

11、处理粪便和动物组织一样吗？

答：前处理不一样的。具体操作说明书都有写。

12、粪便是不能带多余的水分的吗？

答：带点水也没关系，粪便本来就从养殖水中捞出来的，多少都会沾点水。

13、细菌&弧菌(BNV)核酸测试剂盒，这个是测比值的还是能够测出两个的具体值？

答：不是比值。是两个病原体的具体浓度。具体操作和单重的差不多，只是在样本设置时总菌目标基因选择 FAM，弧菌选择 HEX。

14、取样 200mg 在离心管里面大概有多少？

答：在 1.5ml 离心管中，大概 1.5~2 厘米高。

15、HPV 的检测试剂测的是什么？

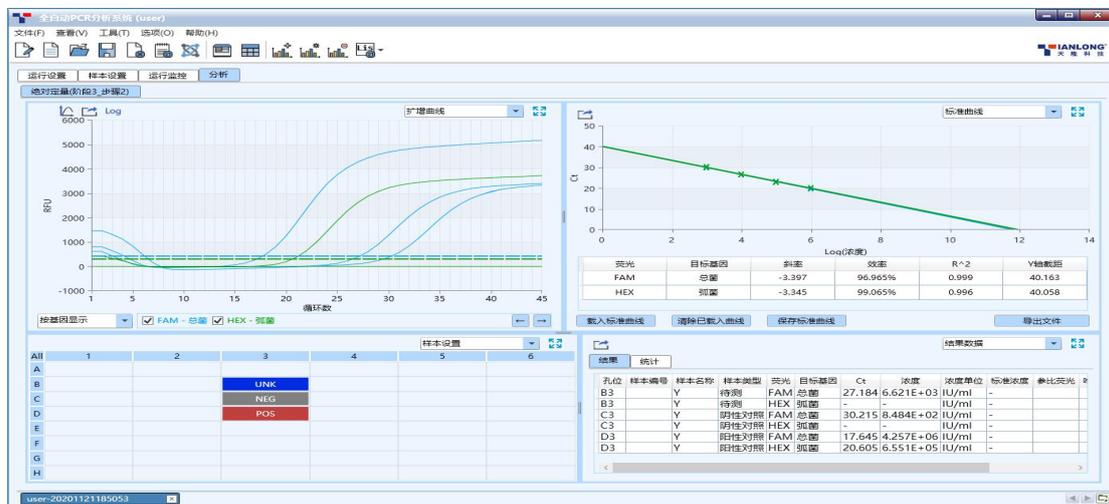
答：对虾肝胰腺细小病毒（HPV）。

16、检测试剂的灵敏度是多少？

答：检测限 1~2 个拷贝。

17、下图细菌&弧菌二重检测试剂盒的检测结果合理吗，阴性对照总菌有拐点，弧菌却没有。

答：正常的，这个试剂盒 FAM 通道细菌总数阴性对照 $CT \geq 28$ 、阳性对照 $CT \leq 30$ ；HEX 通道弧菌阴性对照 $CT \geq 45$ 、阳性对照 $CT \leq 30$ 。



18、试剂盒 (EMS-P/EHP-18S) 的说明书弄丢了, 用试剂盒 (EHP/EMS) 的说明书进行操作导致结果误检。

答: 如果看着说明书操作的话, 我们建议看一下试剂盒名称和说明书的名称是否一致, 以免导致误检。

19、不同批号的病原体核酸测试剂盒的标曲是否共用?

答: 是的。

20、红料、黑料取样量多少?

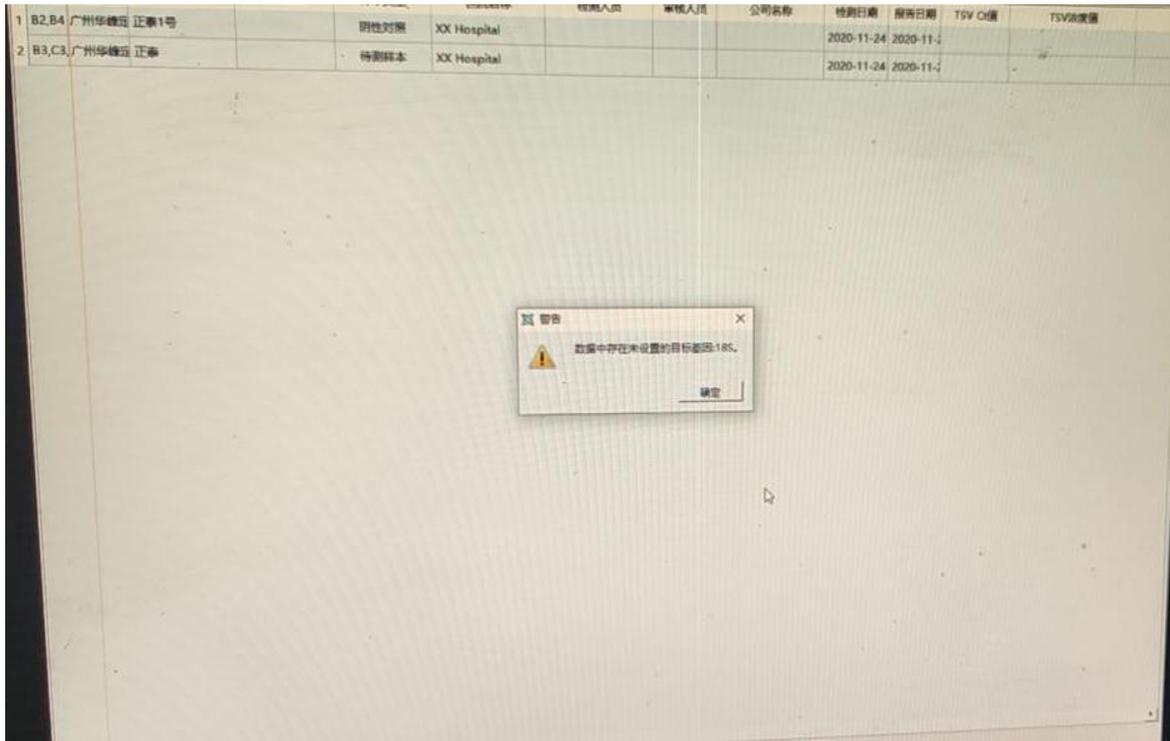
答: 10mg.

21、如果只检测 EMS, 但是阳性对照可用 EHP 的试剂做吗?

答: 不可以, 阳性对照的作用是检测试剂有没有失效或者检测试剂的性能, 检测 EMS, 用 EHP 做阳性对照没有意义。

关于报告系统 Q&A:

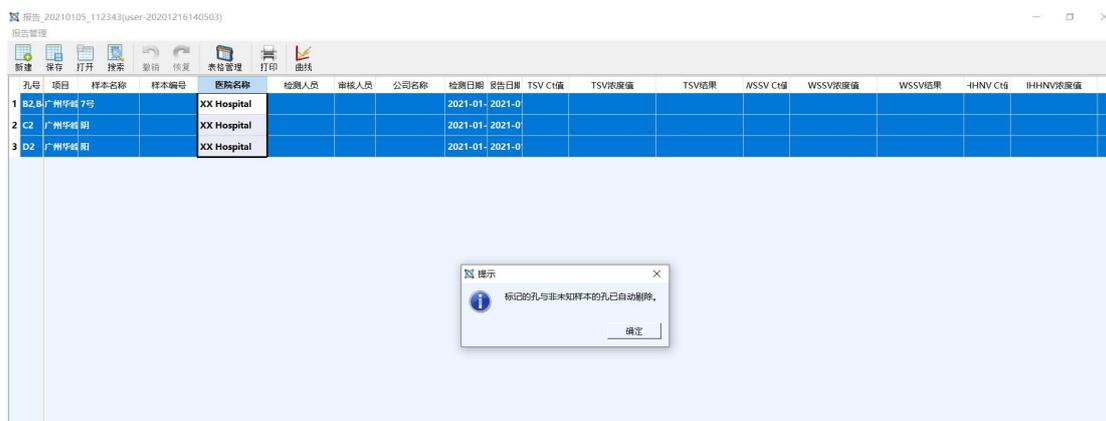
1、使用报告系统打印时，弹出这个界面，怎么回事？



答：把实验文件样本设置那里的 18S 改成 EHP-18S。使用报告系统时要保证下图中的检测项目和样本设置时的基因名称一致，大小写也要一致，如果不一样的话就会出现“数据中存在未设置的目标基因 18S”这种情况。



2、使用报告系统打印实验结果时，出现以下情况的原因？



答：打印报告时不能打印阴阳对照的结果，取消选择阴阳对照的孔号即可。

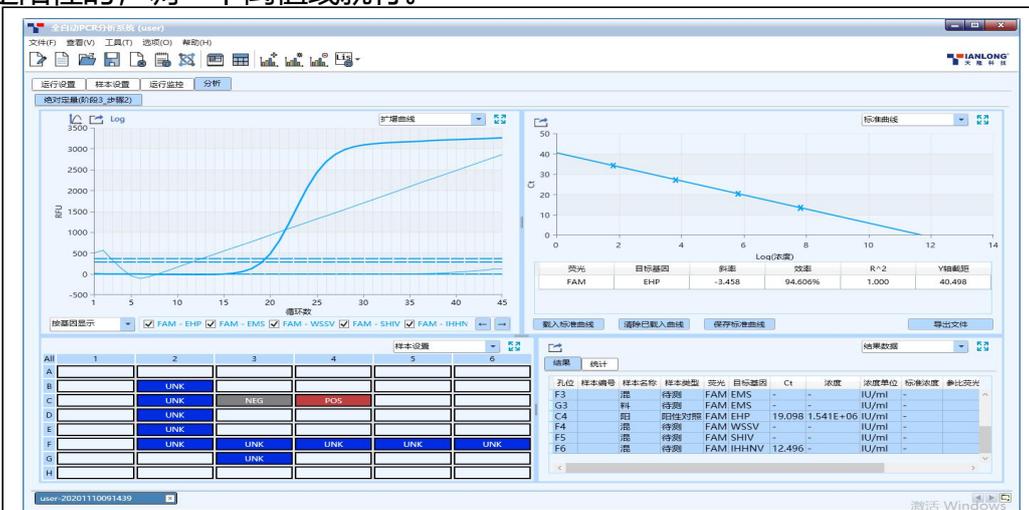
3、实验报告系统打印时，弹出“标记的孔与非未知样本的孔不能打印或预览，请选择其他的孔”的界面，原因是什么？

答：阴阳性对照的样本名称不能和待测样品的样本名称一致，修改一下阴阳性对照的样本名称即可。

关于检测结果 Q&A:

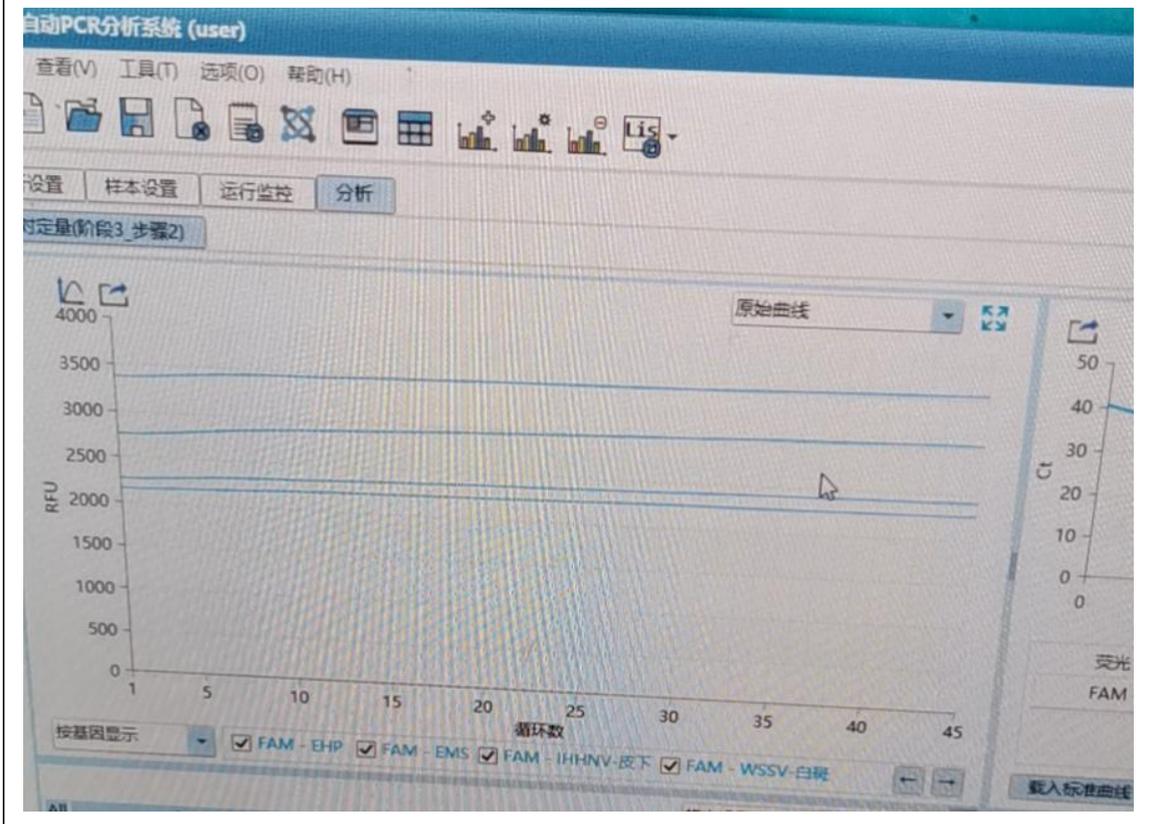
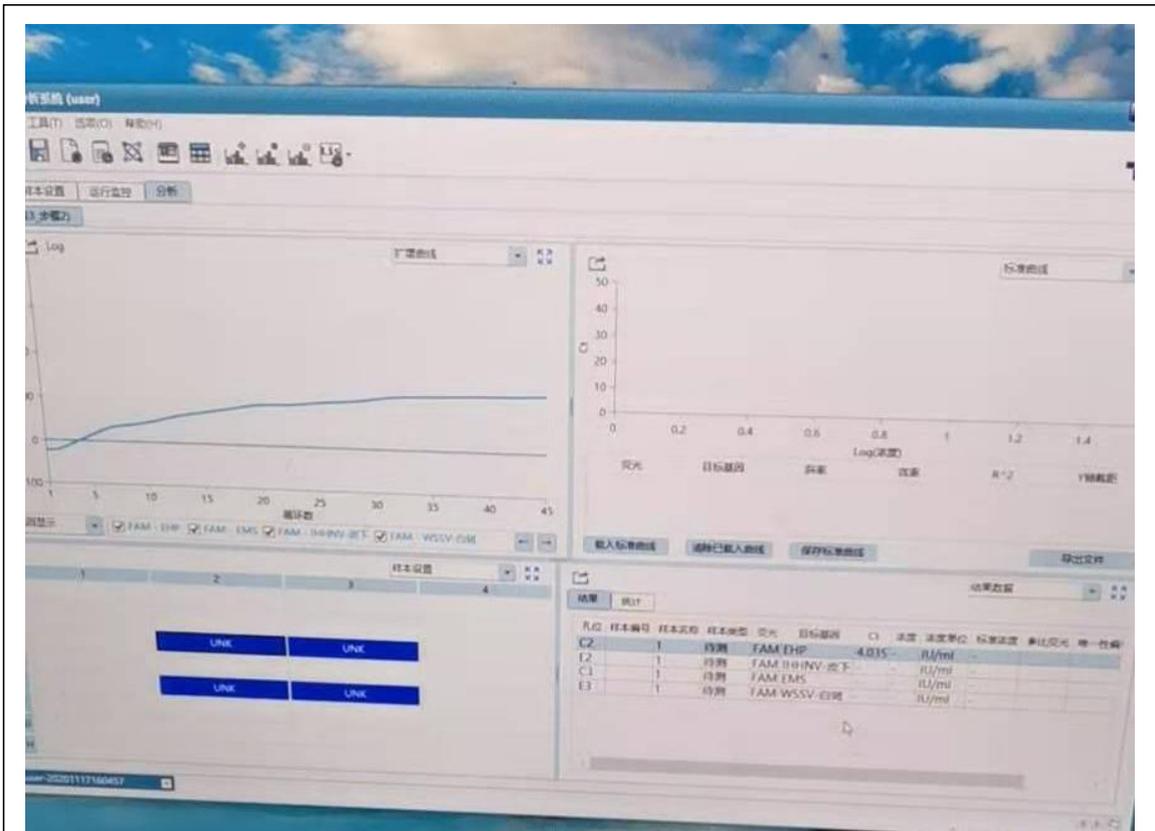
1、IHHNV 检测结果是阴性还是阳性？仪器有没有问题？

答：当扩增曲线异常或者 CT 值具有可疑性时，建议结合原始曲线和实时荧光判读结果，下图是阴性结果。这不是仪器分析有问题，出现这种情况的因为是在 PCR 管内有细微气泡影响导致的，那些气泡没有完全去除就会导致曲线呈现出这样子的形状，出现这样的曲线的时看一下原始曲线和实时荧光，只要确定它没有扩增，不是阳性的，调一下阈值线就行。



以下几种情况是阴性的，调整一下阈值线就可以解决此类问题。

(1)



(2)

文件(F) 查看(V) 工具(T) 帮助(H)

运行设置 | 样本设置 | 运行数据 | 分析

绝对值(相对于步骤0)

名称	目标浓度	浓度	效率	R ²	Y轴截距
FAM	EHP	-3.458	94.00%	1.000	40.498

数据表

孔	1	2	3	4	5	6
A		LINK	LINK	LINK	LINK	LINK
B		LINK	LINK	LINK	LINK	LINK
C		NEG				
D		POS				
E						
F						
G						
H						

孔ID 样本编号 样本名称 样本类型 孔ID 初始浓度 C₀ 浓度 效率单位 效率数据 步长/孔 唯一标识码 数据组 QC

B2	2500	病毒	FAM EHP	-	-	RU/ml	-				通过
C2	3500	病毒	FAM EHP	34.582	5.135E+01	RU/ml	-				通过
D2	阳	阳性对照	FAM EHP	-	-	RU/ml	-				通过
E2	阳	阳性对照	FAM EHP	19.449	1.220E+06	RU/ml	-				通过
B3	病毒	FAM EMS	-	-	RU/ml	-					通过
C3	病毒	FAM EMS	-	-	RU/ml	-					通过
B4	病毒	FAM WSSV	-	-	RU/ml	-					通过
C4	病毒	FAM WSSV	-	-	RU/ml	-					通过
B5	病毒	FAM IHNV	-	-	RU/ml	-					通过
C5	病毒	FAM IHNV	-	-	RU/ml	-					通过
B6	病毒	FAM SHV	-	-	RU/ml	-					通过
C6	病毒	FAM SHV	-	-	RU/ml	-					通过

日期: 2023/10/17 11:05

文件(F) 查看(V) 工具(T) 帮助(H)

运行设置 | 样本设置 | 运行数据 | 分析

实时荧光

步骤0 步骤1 步骤2 步骤3 步骤4 步骤5

0.0°C 95.0°C 94.0°C 94.0°C 94.0°C 80.0°C 80.0°C 65.0°C

00:00 00:15 00:25

初始阶段 病毒灭活阶段 冷却阶段

孔ID 样本编号 样本名称 样本类型 孔ID 初始浓度 C₀ 浓度 效率单位 效率数据 步长/孔 唯一标识码 数据组 QC

Bentley 487												
-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

IP地址: 192.168.0.10

状态: 未知 阶段: --/-- 循环: --/-- 步骤: --/--

剩余时间: --

日期: 2023/10/17 11:05

文件(F) 查看(V) 工具(T) 帮助(H)

运行设置 | 样本设置 | 运行数据 | 分析

绝对值(相对于步骤0)

名称	目标浓度	浓度	效率	R ²	Y轴截距
FAM	EHP	-3.458	94.00%	1.000	40.498

数据表

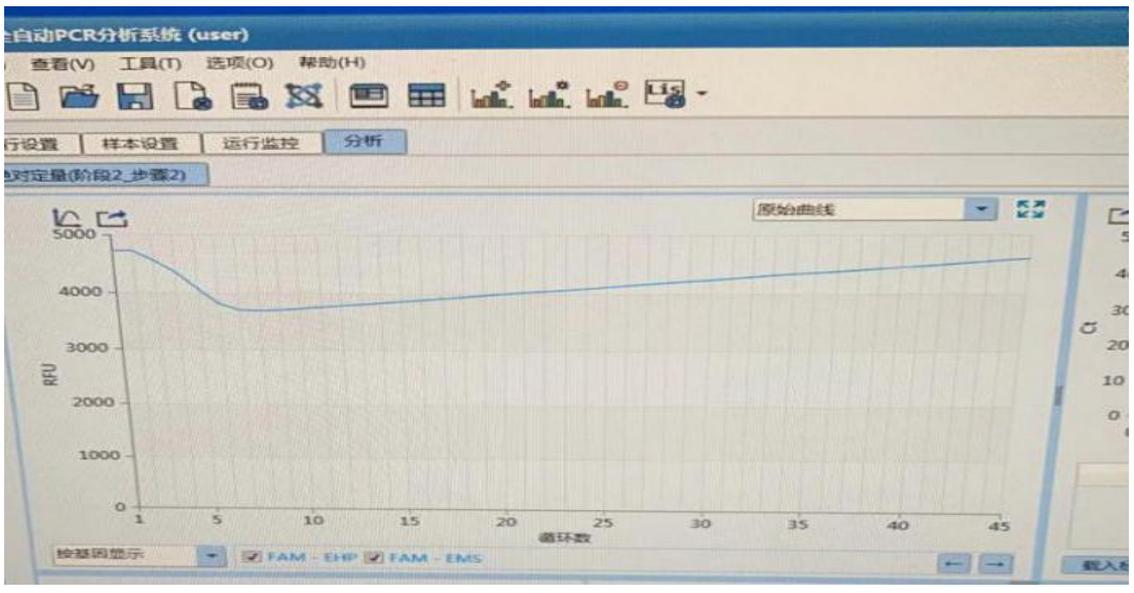
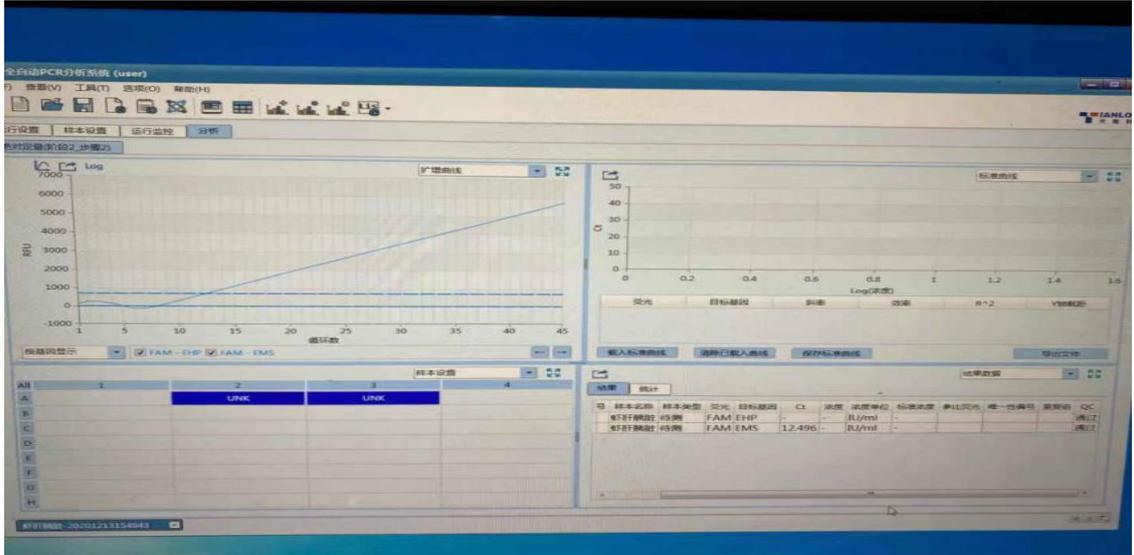
孔	1	2	3	4	5	6
A		LINK	LINK	LINK	LINK	LINK
B		LINK	LINK	LINK	LINK	LINK
C		LINK	LINK	LINK	LINK	LINK
D		NEG				
E		POS				
F						
G						
H						

孔ID 样本编号 样本名称 样本类型 孔ID 初始浓度 C₀ 浓度 效率单位 效率数据 步长/孔 唯一标识码 数据组 QC

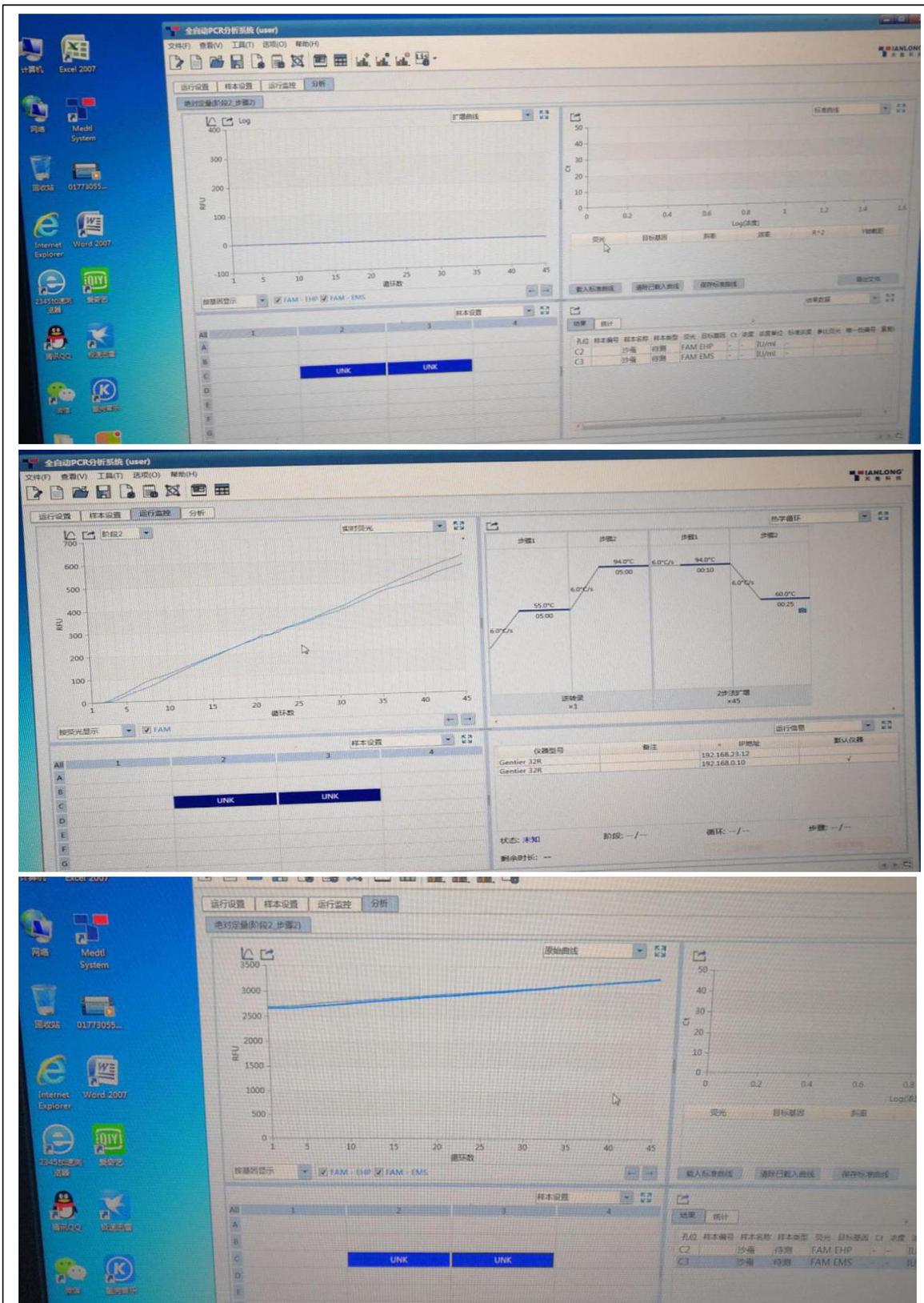
B2	2500	病毒	FAM EHP	-	-	RU/ml	-				通过
C2	3500	病毒	FAM EHP	34.582	5.135E+01	RU/ml	-				通过
D2	阳	阳性对照	FAM EHP	-	-	RU/ml	-				通过
E2	阳	阳性对照	FAM EHP	19.449	1.220E+06	RU/ml	-				通过
B3	病毒	FAM EMS	-	-	RU/ml	-					通过
C3	病毒	FAM EMS	-	-	RU/ml	-					通过
B4	病毒	FAM WSSV	-	-	RU/ml	-					通过
C4	病毒	FAM WSSV	-	-	RU/ml	-					通过
B5	病毒	FAM IHNV	-	-	RU/ml	-					通过
C5	病毒	FAM IHNV	-	-	RU/ml	-					通过

日期: 2023/10/17 11:05

(3)



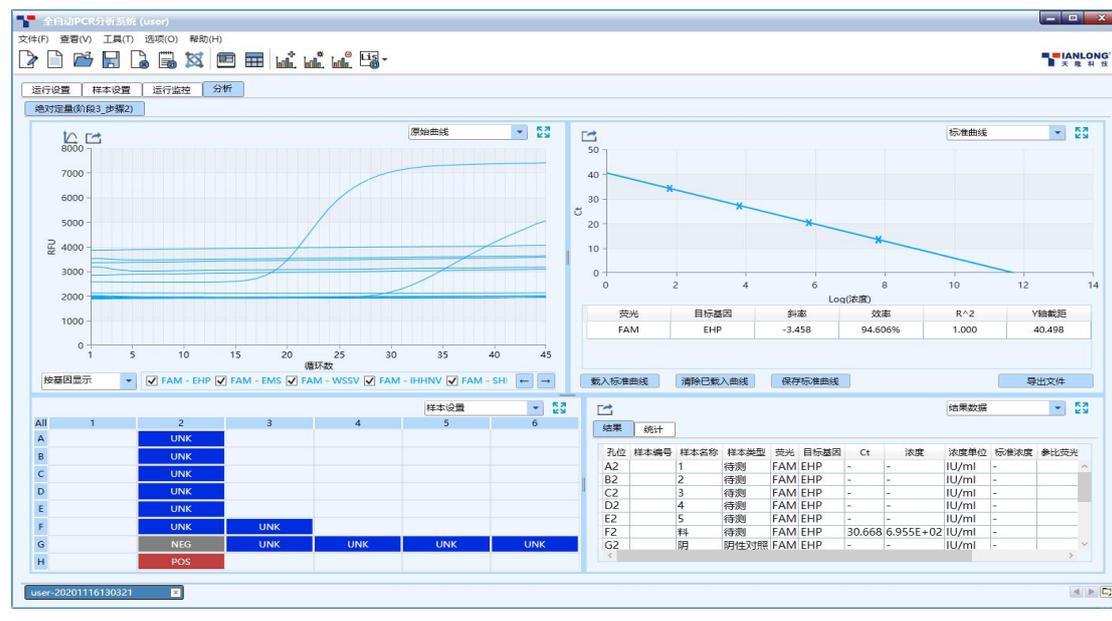
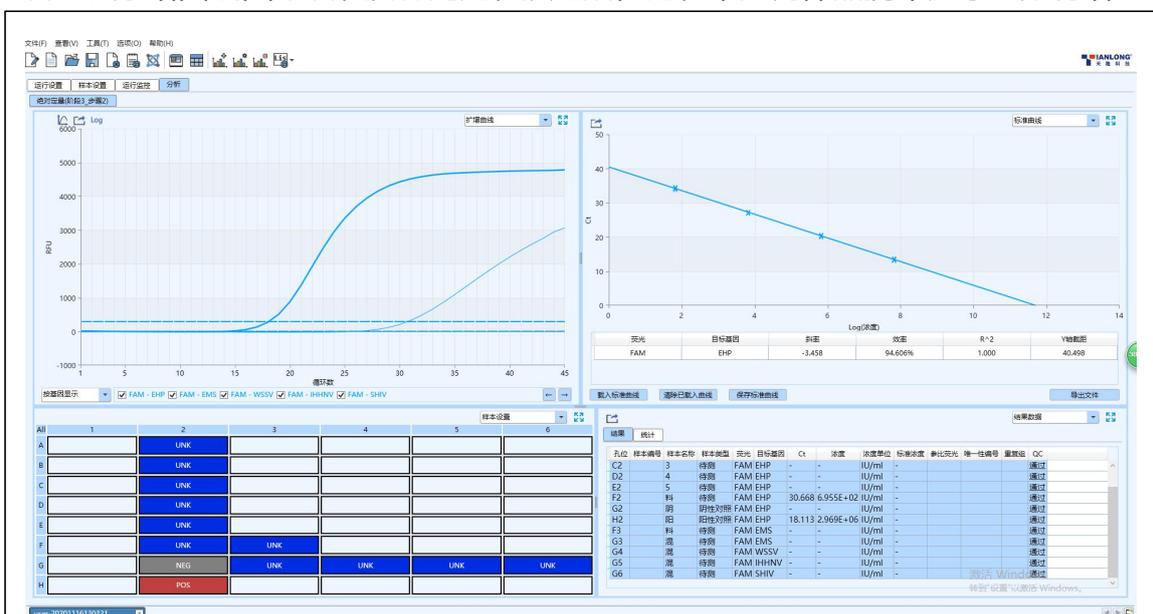
(4)



注意: 平常做检测不做阴阳对照的话, 建议经常检测的项目每隔半个月一定要做阴阳对照(阴性对照检查检测环境是否有无被污染; 阳性对照检查检测试剂是否有效)。

2、这个结果有问题吗，这是检测饲料的。

答：从原始曲线图来看，没有问题，就是阳性的，即检测样品携带孢子虫病原体。



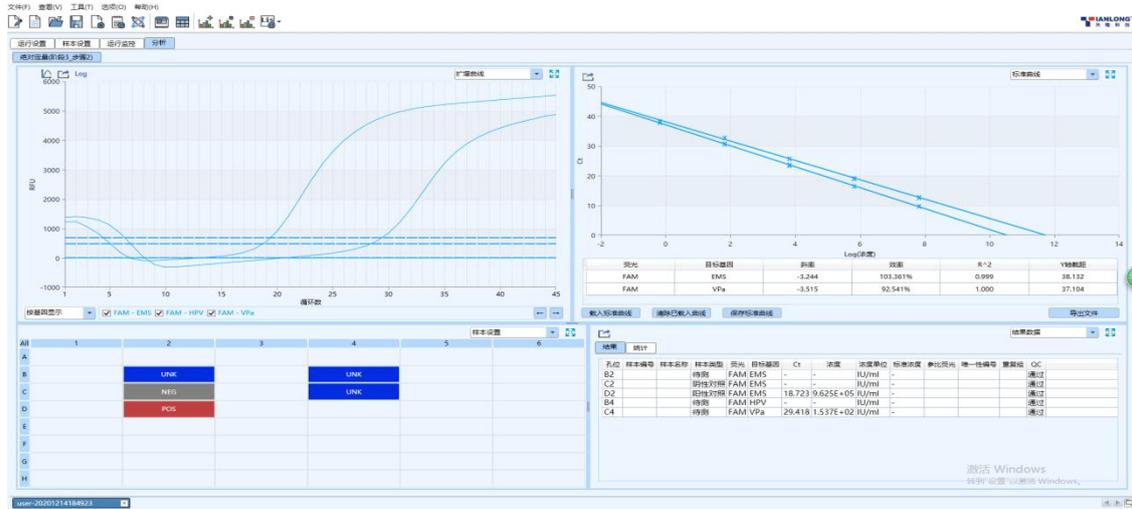
3、第一次 ct 为 39，第二次阴性，第三次 ct42 多，能判断是阳性吗？

答：可以，是弱阳性的。

4、CT 值什么，有单位吗？

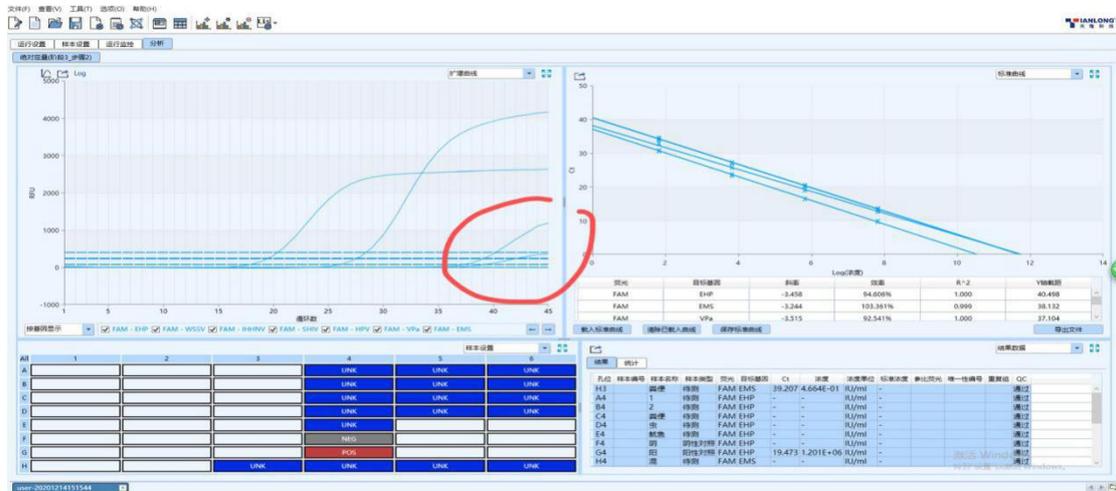
答：CT 值没有单位，CT 值从基线到指数增长的拐点所对应的循环次数，用于判读 PCR 扩增快慢的数值，CT 越小，扩增速率越快，说明病原体含量越高。

5、这个图是不是说明核酸存在抑制物啊？还是仪器没调好啊，机器空跑了一段。



答：前面几个循环有波动的话一般都是受细微的气泡影响的。上机前做 20~30 秒简短离心去除气泡。（注意：离心结束后再注意观察管内还有无气泡）

6、像这样的小起峰，一般是什么意思？



答：提取到的病原体核酸含量极低，几个拷贝这样子，就会出现这样的曲线，一般 CT 值接近 38 点多，39 点多这样我们都是建议复检一次。

7、为什么检测结果没有浓度值？

答：要看浓度值的话得先导入标准曲线。

8、第一次检测 ct 值为 39，第二次检测阴性。为什么差异这么大？

答：原因①可能第二次复检的时候样品核酸降解了，没有提取到病原体就会出现

阴性结果。②与取样有关，病原体浓度低时不是每尾虾都感染了病原体，第一次抽到阳性虾苗，第二次抽到阴性虾苗，就会出现这种结果。（注意：复检的时候重新提取核酸用于检测，第一次提取的核酸保存不当或者提取出来的时间过长核酸降解了会导致结果误检）

9、前几天检测虾苗孢子虫阴性，几天后检测出阳性，是什么原因？

答：①虾苗体内的 EHP 含量不高，低于检测限，几天后含量变高，高于检测限，可以检测到；②养殖池残留 EHP，养殖一段时间后被检测出；③个别虾苗携带 EHP，一开始取样阴性个体，未检测出，几天后取样到阳性个体；④与操作有关系，操作不当可能导致未提取到病原体核酸。

10、实验结果扩增曲线空白的原因？

答：实验过程中电脑休眠就会导致实验结果扩增曲线空白。可用 U 盘从仪器上拷贝实验文件到电脑上看结果。（注意：取消电脑休眠状态，防止下次出现这种情况）

11、怎么定量分析病原体含量？

答：导入我司提供的对应标准曲线即可定量分析病原体含量。

12、导入标准曲线怎么看浓度值？

答：仪器上浓度值是采用科学计数法的形式呈现，例如 3.077E-02 即表示 “ 3.077×10^{-2} ” 或 “0.03077”，3.077E+02 即表示 “ 3.077×10^2 ” 或 “307.2”，单位是 copies/ul，意思是每微升含有 3.077×10^{-2} 个或者 3.077×10^2 个病原体。

13、界面弹出同名文件的原因？

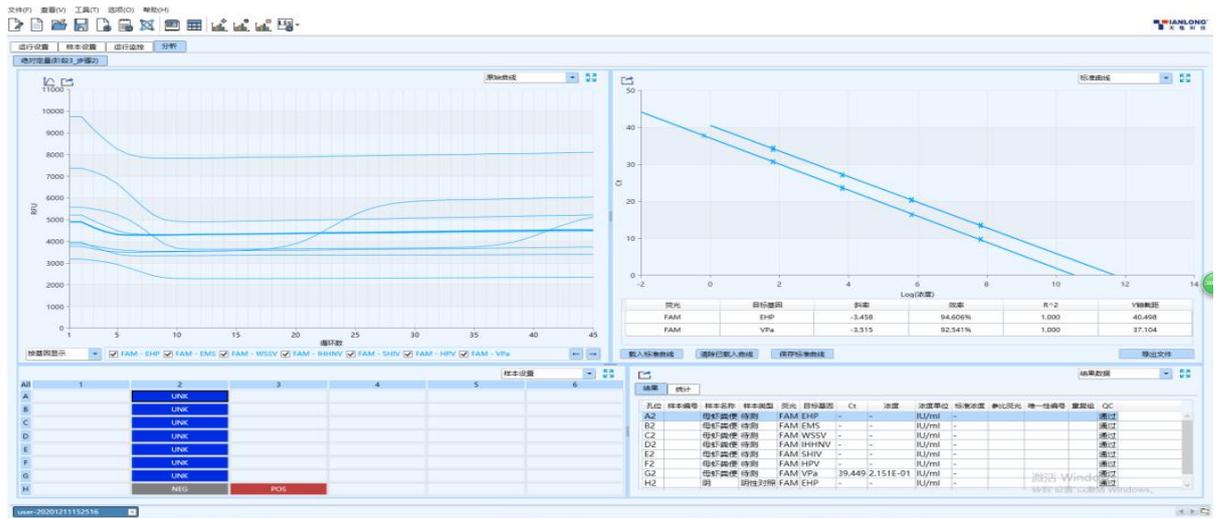
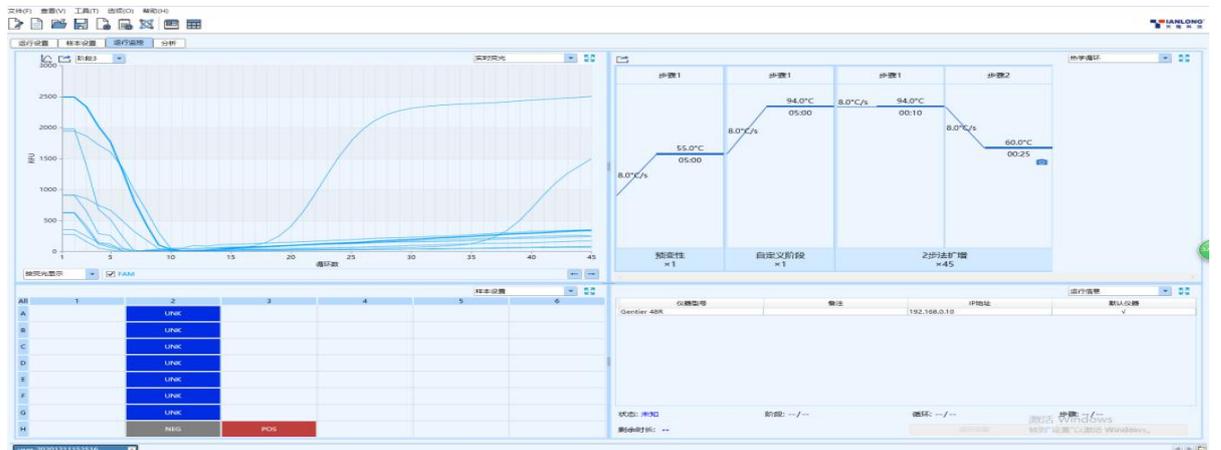
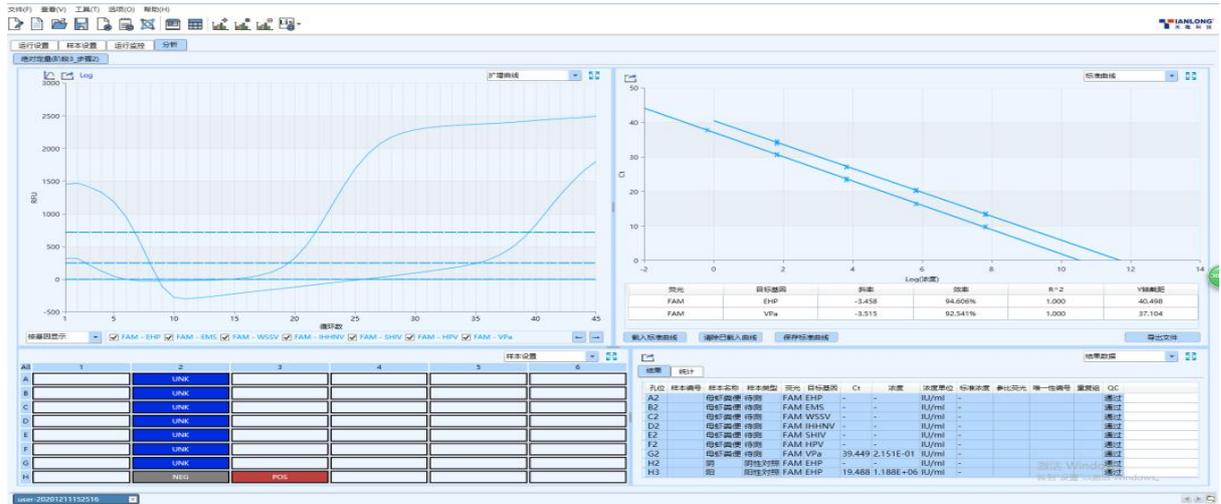
答：实验文件同名，将仪器上的文件名称重命名再拷贝到电脑上看实验结果。

14、扩增曲线与 CT 值数值不符，什么原因造成的？



答：结合运行监控和原始曲线图来看，CT 值应处于接近 40 左右，这是软件处理数据的问题，线做的不好的话就容易导致这种情况发生，出现这种情况建议结合原始曲线判读结果。

15、这是什么结果？



答：受气泡影响曲线不太美观，但结合原始曲线和运行监控来看，实验结果没有异常，但 ct 为 39 点多了建议复检一下。

关于仪器 Q&A:

1、试验完以后仪器如何保养的?

1) 正常实验结束后的清洁/消毒:

①实验正常结束，等待 3 分钟以上，待仪器温度降低后再打开仪器，及时丢弃使用过的 PCR 管，不可打开 PCR 管，防止管中 DNA 逸出，仪器使用完毕关闭电源之后，用防尘罩罩住仪器，减少灰尘进入仪器。

②每天实验完成之后，可以用紫外灯对 PCR 实验室照射照射消毒 30-60min。

③定期清理清洁仪器，关闭电源，用脱脂棉签沾少量 70%酒精小心擦拭加热模块，擦拭完待酒精完全挥发之后才能接通电源，仪器的外表面可以用干净抹布擦拭。

2) 发生意外情况紧急处理：实验后打开热盖如发现以下情况：PCR 管爆管、开盖、变形；PCR 管管盖并行，打开；或有扩增试剂洒在仪器加热仓表面或者加热孔里面，应立即进行以下操作：

①戴手套，将 PCR 管先装进自封袋，将自封袋口封住。

②更换手套，使用干棉签将洒落的液体吸走，注意此过程棉签不要进行涂抹，以免扩大污染面积。再使用棉签蘸取纯水（棉签湿润即可）对污染区域进行清洁（清洁 3-5 次）。

③用棉签蘸取擦拭污染区域，并打开实验室窗户、门对实验室进行通风。

④通风 12 小时后，应先在扩增间将纯净水倒在瓶盖里，暴露 30min 后，以此为模板，直接加入到配制好的（10 人份）扩增试剂中，上机检测，结果全为阴性，即可进行正常实验，如有阳性，则初步判定为实验室污染，需深度消除污染后再做正常样本检测。

2、换主机需要重新安装软件吗?

答：需要，将安装包拷贝到 U 盘上，换完主机后再将安装包拷贝到电脑上重新安装。

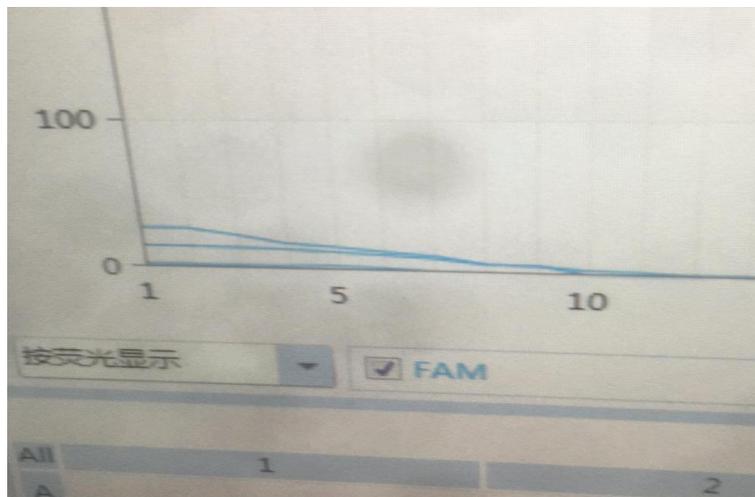
3、做完实验把 PCR 试剂管从仪器上拿下来，发现试剂管变形了，这是什么情况？

答：检测量少于 4 管的时候，在仪器四个角也要放空的试剂管用于支撑，在仪器运行过程中，为防止反应试剂蒸发，顶盖加热至 105℃并有一定下压力压住 PCR 管盖，如果 PCR 管数量少于 4 管，管子难以承受压力从而被压扁。

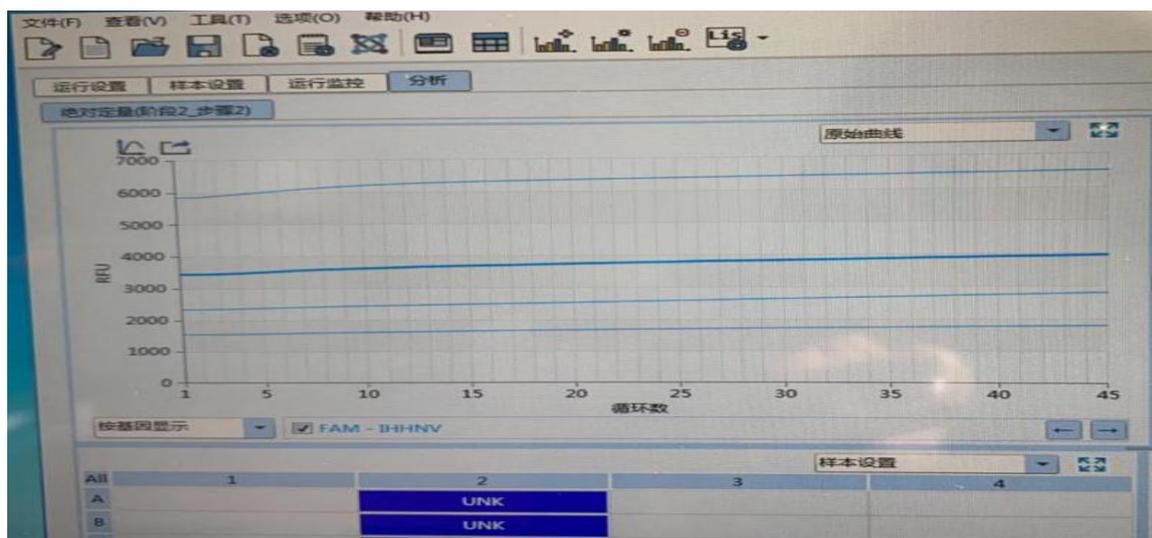
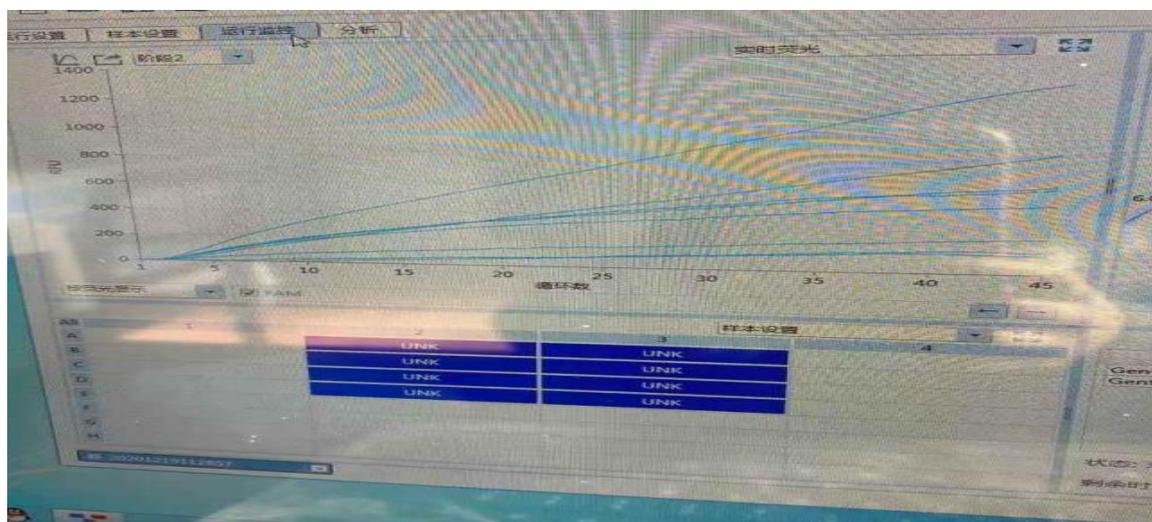
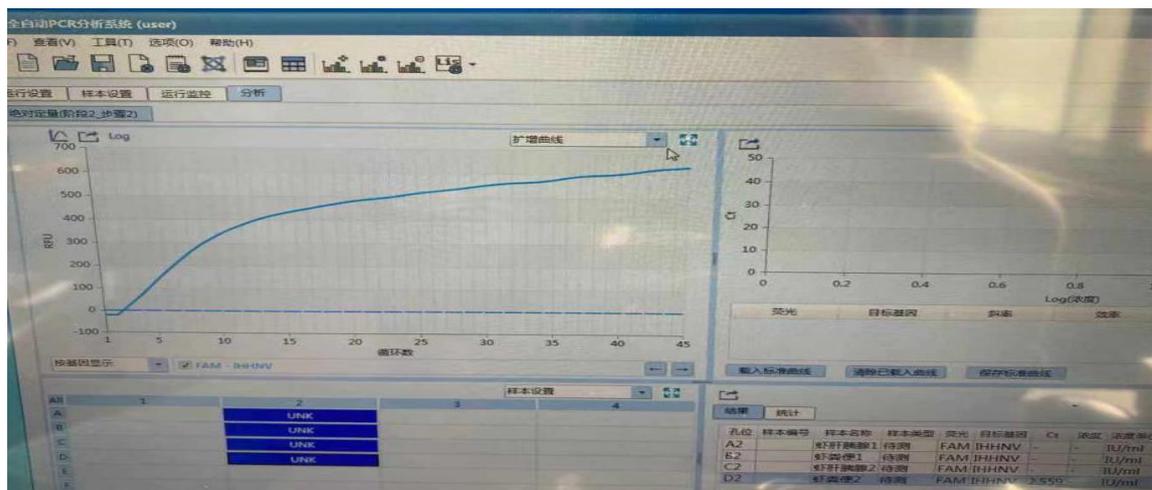


4、这个机器是新装不久的，客户那边的检测员反馈，放试剂进去检测，荧光一直都是不会从零开始走，一直都是几条线一起从上面一直降下来，这种情况是怎么回事？客户那边有五六台仪器，用旧的仪器就不会出现这种情况，唯独这台新的就有这种问题。

答：厂家说这种情况不影响结果判读。



5、每次做完，看运行曲线是这样的，怎么回事呢？



答：从原始曲线来看曲线没有扩增（呈水平线）是阴性结果。这种情况是仪器问题导致扩增曲线异常。