

犬细小病毒 PCR 检测试剂盒使用说明书

用途 犬细小病毒（CPV）的聚合酶链反应（PCR）试验用于犬血清、粪便和肠道、心脏、肺脏等组织中的 CPV，适用于 CPV 的检测、诊断和流行病学调查。

原理 提取病料 DNA 作为模板，高温使模板的一条双链 DNA 变性后形成两条单链，低温使引物与互补的模板形成双链，中温时，在 TaqDNA 聚合酶作用下，以 dNTP 为原料，以引物为复制的起点，沿模板合成一条新链。每个循环包括：高温变性、低温退火、适温延伸三个过程。每一次循环使扩增的 DNA 片段拷贝数放大一倍。经过 35 次循环，使扩增的 DNA 片段放大了数百万倍。将扩增产物进行电泳，经染色后，在紫外灯照射下，肉眼可见到 DNA 片段的扩增带。

试剂盒组成

名称	10 头份	50 头份	贮藏条件
0.2 mL 薄壁 PCR 管	15 个	60 个	室温（A 盒）
DNA 吸附柱和收集管	10 套	50 套	
消化液	2.4 mL	11mL	
DNA 结合液	3.6 mL	16mL	
DNA 洗涤液	12 mL	52mL	
DNA 洗脱液	1 mL	4 mL	
矿物油	300 μ L	1.2 mL	
50 倍 TAE 电泳缓冲液（50 倍稀释后使用）	20 mL	100 mL	
染色液	20 μ L	50 μ L	
蛋白酶 K	240 μ L	1.1mL	-20 $^{\circ}$ C（B 盒）
阴性对照	350 μ L	1 mL	
阳性对照	350 μ L	1 mL	
PCR 反应液	200 μ L	1 mL	
Taq DNA 聚合酶	25 μ L	120 μ L	

保存期 本产品有效期为 6 个月。

需要自备的物品

1. 仪器：分析天平、水浴锅、离心机、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪（或紫外分析仪）、微波炉、组织研磨器、-20 $^{\circ}$ C 冰箱、可调移液器（2 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L）。
2. 耗材：眼科剪、眼科镊、称量纸、20 mL 一次性注射器、1.5 mL 灭菌离心管、琼脂糖、500 mL 量筒、500 mL 锥形瓶、吸头（10 μ L、200 μ L、1000 μ L）、灭菌双蒸水。

注意事项

1. 所有接触病料的物品均应合理处置，以免污染实验室。
2. PCR 整个试验分配液区、模板提取区、扩增区、电泳区。流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区→电泳区。严禁器材和试剂倒流。
3. 所有试剂应在规定的温度储存。-20 $^{\circ}$ C 保存的各试剂管使用前应完全融化，8000 rpm 离心 15 s，使液体全部沉于管底，放于冰盒中，吸取液体时移液器吸头尽量在液体表面层吸取，使用后立即放回-20 $^{\circ}$ C。
4. 消化液低温时可能出现结晶，请于 37 $^{\circ}$ C 温育，溶解至澄清透明后使用。
5. 染色液低毒，操作时应戴上手套，避光保存，较长时间不使用请存放于 4 $^{\circ}$ C，以免挥发变干。染色液和上样缓冲液使用前也请离心使液体沉于管底。
6. 注意防止试剂盒组分受污染。不要使用超过有效期限的试剂，试剂盒之间的成分不要混用。

7. 严格遵守操作说明可以获得最好的结果。操作过程中移液、定时等全部过程必须精确。
8. 反复冻融试剂将减低检测灵敏度，建议在3次内用完，请严格按试剂盒说明书操作。

样品制备

- 1 样品采集：**病死犬，取脑、心脏、肺脏等组织病变部与健康部交界处组织；待检病犬，用棉拭子取排泄物，置于50%甘油生理盐水中或者将粪便取到无菌的小青瓶中；待检病犬，用注射器取血2mL。2~8℃保存，送实验室检测。（要求送检病料新鲜，严禁反复冻融病料。）
- 2 样品处理：**每份样品分别处理。
 - 2.1 组织样品处理：**每份组织分别从三个不同的位置称取样品约1g，用手术剪剪碎混匀后取0.05g于研磨器中研磨，加入1.5mL生理盐水继续研磨，待匀浆后转至1.5mL灭菌离心管中，8000rpm离心2min，取上清液100μL于1.5mL灭菌离心管中，再加入200μL消化液和20μL蛋白酶K，振荡混匀后，置56℃水浴中消化1小时。
 - 2.2 排泄物的处理：**将排泄物振荡混匀或取粪便约0.05g到离心管中加入1.5mL生理盐水振荡混匀，8000rpm离心2min，取上清液100μL于1.5mL灭菌离心管中，再加入200μL消化液和20μL蛋白酶K，振荡混匀后，置56℃水浴中消化1小时。
 - 2.3 全血样品处理：**待血凝后取血清100μL，加入200μL消化液和20μL蛋白酶K，振荡混匀后，置56℃水浴中消化1小时。
 - 2.4 阳性对照处理：**取阳性对照100μL，加入200μL消化液和20μL蛋白酶K，振荡混匀后，置56℃水浴中消化1小时。
 - 2.5 阴性对照处理：**取阴性对照100μL，加入200μL消化液和20μL蛋白酶K，振荡混匀后，置56℃水浴中消化1小时。

操作步骤

1 病毒DNA的提取

- 1.1 从水浴锅中取出样品管，降至室温后，加入300μL DNA结合液，颠倒混匀，将全部液体移入吸附柱中（吸附柱要套上收集管，吸取液体时尽量不要吸到悬浮杂质，以免离心时堵塞吸附柱），室温静置3min，10000rpm离心30s。
- 1.2 弃去收集管中液体，加入500μL DNA洗涤液，10000rpm离心30s。
- 1.3 重复步骤1.2。
- 1.4 弃去收集管中液体，10000rpm空柱离心1min，以除去残留的DNA洗涤液。
- 1.5 将吸附柱放入新的1.5mL离心管中，向柱中央加入DNA洗脱液（最好56℃预热）50μL，室温放置2min，10000rpm离心30s，离心管中液体即为模板DNA。

2 PCR扩增

每份总体积20μL，含16μL PCR反应液（用前混匀），2μL Taq DNA聚合酶，2μL模板DNA。

例如：n份样品，配制n+1份，16×(n+1) PCR反应液，再加入2×(n+1) Taq DNA聚合酶，混匀后取18μL分装成n份，分别加入2μL模板DNA，加入20μL矿物油覆盖（有热盖的PCR扩增仪不用加），作好标记。

在PCR扩增仪上进行以下程序：95℃ 3min；循环94℃ 30s，55℃ 30s，72℃ 30s，共35次；再72℃延伸10min。

3 电泳

称3g琼脂糖放于500mL锥形瓶中，加入50倍稀释的TAE电泳缓冲液200mL（取4mL 50倍TAE电泳缓冲液，用双蒸水稀释至200mL），于微波炉中熔解，再加入10μL染色液混匀。在电泳槽内放好梳子，倒入琼脂糖凝胶，待凝固后将PCR扩增产物10μL，点样于琼脂糖凝胶孔中，以110~120V电压于50倍稀释的TAE电泳缓冲液中电泳，紫外灯下观察结果。

结果判定 阳性对照出现420bp扩增带、阴性对照无带出现（引物带除外）时，实验结果成立。被检样品出现420bp扩增带为CPV阳性，否则为阴性。