口蹄疫病毒 Asia-1 型 RT-PCR 检测试剂盒使用说明书

用途 口蹄疫病毒 Asia-1 型（FMDV Asia-1 型）反转录聚合酶链反应（RT-PCR）检测试剂盒，用于检测疑似感染动物的水疱皮或水疱液中的 FMDV Asia-1 型，适用于 FMDV Asia-1 型的检测、鉴定和流行病学调查。

原理 利用离心柱内硅基质膜提取 RNA，在反转录酶的作用下，以 RNA 为模板，以引物为起点合成与 RNA 模板互补的 cDNA 链。在 TaqDNA 聚合酶的作用下，经高温变性、低温退火、中温延伸的循环，使特异 DNA 片段的拷贝数放大一倍。经过 35 次循环，最终使扩增 DNA 片段放大了数百万倍。将扩增 DNA 片段进行电泳，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）
吸附柱和收集管	10 套	50 套	
裂解液	6 mL	30 mL	
洗液	12 mL	60 mL	
洗脱液	1 mL	10 mL	
矿物油	300 µL	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 µL	50 µL	
上样缓冲液	50 µL	250 µL	
阴性对照	**350 µL**	**1 mL**	**-20 ℃（B 盒）**
阳性对照	**350 µL**	**1 mL**	
RT-PCR 反应液	**200 µL**	**1 mL**	
X 液	**5 µL**	**10 µL**	
酶混合液	**15 µL**	**65 µL**	

保存期 本产品有效期为 6 个月。

需自备的物品

1．仪器：分析天平、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 ℃冰箱、可调移液器（2 µL、20 µL、200 µL、1000 µL）。

2．耗材：眼科剪、眼科镊、称量纸、20 mL 一次性注射器、生理盐水、琼脂糖、500 mL 量筒、500 mL 锥形瓶、经焦碳酸二乙酯（DEPC）水处理的灭菌 1.5mL 离心管和吸头（10 µL、200 µL、1000 µL）、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℃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 ℃。

4．在 RNA 提取过程中，避免 RNA 酶污染，尽量缩短操作时间。

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℃，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：病死或扑杀的偶蹄动物，取溃烂或溃疡的表皮组织等；待检的活动物，取水泡皮或水疱液，置于 50%甘油生理盐水中。2～8 ℃保存，送实验室检测。（要求送检病料新鲜，严禁反复冻融。）

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 0.05 g 于研磨器中研磨，加入 1.5 mL 生理盐水继续研磨，待匀浆后转至 1.5 mL 灭菌离心管中，8000 rpm 离心 2 min，取上清液 100 μL 于 1.5 mL 灭菌离心管中。

2.2 水疱液处理：取 100 μL，置 1.5 mL 灭菌离心管中。

2.3 阳性对照处理：取阳性对照 100 μL，置 1.5 mL 灭菌离心管中。

2.4 阴性对照处理：取阴性对照 100 μL，置 1.5 mL 灭菌离心管中。

操作步骤

1 病毒 RNA 的提取

1.1 取已处理的样品、阴性对照和阳性对照，分别加入裂解液 600 μL，充分颠倒混匀，室温静置 3～5 min。

1.2 将液体吸入吸附柱中（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），13000 rpm 离心 30 s。

1.3 弃去收集管中液体，加入 600 μL 洗液，13000 rpm 离心 30 s。

1.4 重复步骤 1.3。

1.5 弃去收集管中液体，13000 rpm 空柱离心 2 min，以除去残留的洗涤液。

1.6 将吸附柱移入新的 1.5 mL 离心管中，向柱中央加入洗脱液 50 μL，室温静置 1 min，13000 rpm 离心 30 s，离心管中液体即为模板 RNA。

2 RT-PCR 扩增

每份总体积 20 μL，含 16.8 μL RT-PCR 反应液（用前混匀），1.2 μL 酶混合液，2 μL 模板 RNA。

例如：n 份样品，配制 n+1 份，16.8×（n+1）RT-PCR 反应液，再加入 1.2×（n+1）酶混合液，混匀后取 18 μL 分装成 n 份，分别加入 2 μL 模板 RNA（**阳性对照管加入 1 μL 阳性对照 RNA 和 1 μL X 液**），加入矿物油 20 μL 覆盖（有热盖的 PCR 扩增仪不用加矿物油），作好标记。

在 PCR 扩增仪上进行以下程序：42 ℃ 45 min，95 ℃ 3 min；循环 95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，共 35 次；再 60 ℃延伸 7 min。

3 电泳

称 4 g 琼脂糖放于 500 mL 锥形瓶中，加入 50 倍稀释的 TAE 电泳缓冲液 200 mL（取 4 mL 50 倍 TAE 电泳缓冲液，用双蒸水稀释至 200 mL），于微波炉中熔解，再加入 10 μL 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 10 μL 混合 2 μL 上样缓冲液，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 292 bp 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 292 bp 或 415 bp 扩增带为口蹄疫病毒 Asia-1 型阳性，否则为阴性。