

犬猫冠状病毒 RT-PCR 检测试剂盒使用说明书

用途 犬猫冠状病毒 (CoV) 的聚合酶链反应 (PCR) 试验用于检测 1) 犬、猫等动物的鼻、咽拭子、粪便、直肠拭子等样品 2) 猫胸、腹腔积液、脑脊液、房水、肾肉芽肿等样品 3) 肠道、肺脏、脾脏、肾脏等组织中冠状病毒 (CoV), 适用于 CoV 的检测、诊断和流行病学调查。

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 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	
阴性对照	350 μ L	1 mL	-20 $^{\circ}$ C (B 盒)
阳性对照	350 μ L	1 mL	
RT-PCR 反应液	200 μ L	1 mL	
酶混合液	15 μ L	65 μ L	

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 $^{\circ}$ 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、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 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. 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 $^{\circ}$ 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：病死动物，取肠道、肺脏、脾脏、肾脏等组织病变部与健康部交界处组织；待检动物，用棉拭子取分泌物，置于50%甘油生理盐水中；待检动物，用注射器取渗出液或胸腹水1mL。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。

2.2 胸腹水样品处理：取100μL，置1.5mL灭菌离心管中。

2.3 分泌物样品处理：将分泌物中加入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。

2.4 阳性对照处理：取阳性对照100μL，置1.5mL灭菌离心管中。

2.5 阴性对照处理：取阴性对照100μL，置1.5mL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600μL，充分颠倒混匀，室温静置3~5min。

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），13000rpm离心30s。

1.3 弃去收集管中液体，加入600μL洗液，13000rpm离心30s。

1.4 重复步骤1.3。

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

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

2 RT-PCR 扩增

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

例如：n份样品（n<10），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，取18μL分装成n份，分别加入2μL模板RNA，加入矿物油20μL覆盖（有热盖的PCR扩增仪不用加矿物油），作好标记。

在PCR扩增仪上进行以下循环：42℃45min，95℃3min；扩增条件为95℃30s，55℃30s，72℃30s，35个循环；72℃延伸10min。

3 电泳

称4g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4mL50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224bp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224bp扩增带为COV阳性，否则为阴性。