

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒、猪轮状病毒 三重实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

本试剂盒采用实时荧光 RT-PCR 方法检测猪排泄物、肠内容物和肠系膜淋巴结中的猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪轮状病毒 (PRV-A) 的 RNA。适用于三种腹泻性疾病的鉴别诊断、检测和流行病学调查。

【原理】

提取样品总 RNA, 在高效反转录酶的作用下, 以 RNA 为模板, 以引物为起点合成与 RNA 模板互补的 cDNA 链。在热启动 Taq 酶的作用下, 经高温变性、中温退火及延伸的循环, 使特异 DNA 片段的拷贝数放大一倍, 经荧光素标记的探针与扩增的 DNA 杂交, 利用 Taq 聚合酶的 5'→3' 外切活性, 使荧光探针的报告基团与淬灭基团分离, 发出特异性荧光信号, 利用荧光 PCR 仪检测特异性荧光信号, 根据样品 Ct 值的大小及扩增曲线的形成情况判定结果。

【试剂盒组成】

组成	50 头份	贮藏条件
阴性对照	1 mL	-20℃
阳性对照	600 μL	
无菌无核酸酶水	600 μL	
RT-PCR 反应液	750 μL	
酶混合液	60 μL	
荧光探针	150 μL	
说明书	1 份	

【需要自备的器材】

1. 试剂: 核酸提取试剂。
2. 仪器: 离心机、荧光 PCR 扩增仪、-20℃ 冰箱、可调移液器 (2μL、20μL、200μL、1000μL)。
3. 耗材: 荧光 PCR 专用反应管、吸头 (10μL、200μL、1000μL)。

【使用注意事项】

1. 建议与世纪元亨提供的柱式 RNA 核酸提取试剂盒配套使用。
2. 实验过程中进行阴性对照和阳性对照样品的质量控制。
3. 所有接触病料的物品均应合理处置, 以免污染实验室。
4. PCR 整个试验分配液区、模板提取区、扩增区。流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区。严禁器材和试剂倒流。
5. 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, 8000rpm 离心 15s, 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, 使用后应立即放回 -20℃。
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. 反应体系应在特定配液区或者超净工作台配制, 整个实验过程严格控制污染。
9. 反复冻融试剂将降低检测灵敏度, 本试剂盒应在 3 次内用完。

【样品采集】

剖检猪取肠内容物和肠系膜淋巴结; 待检活猪, 取排泄物, 于离心管中。2~8℃ 保存, 送实验室检测。(要求送检病料新鲜, 严禁反复冻融。)

【实时荧光 RT-PCR 操作】

设被检样品、阴性对照和阳性对照总和为 N, 则反应体系配制如下:

试剂	体系
无菌无核酸酶水	7.0 × (N+1) μL
RT-PCR 反应液	12.5 × (N+1) μL
酶混合液	1.0 × (N+1) μL
荧光探针	2.5 × (N+1) μL

将以上配制的反应体系充分混匀后, 分装每个反应管中各 23μL。分别取 2 μL 模板 RNA, 加入相应反应管中, 混匀并作好标记, 设置待检探针, 其中 PEDV 荧光报告基因为 FAM, TGEV 荧光报告基因为 HEX (如果仪器没有 HEX 校正, 可暂时用 VIC 代替), PRV-A 荧光报告基因为 CY5 (如果仪器没有 CY5 校正, 可暂时用 LIZ 代替), 淬灭基团均为 None。在荧光 PCR 仪上进行以下反应: 42℃ 5 min, 95℃ 10s; 循环 95℃ 5 s, 60℃ 35 s, 共 40 次, 在每次循环第二步 (60℃ 35s) 收集荧光信号。

【结果判定】

- 1 结果分析条件设定
阈值设定原则: 阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。
- 2 结果描述及判定
阳性对照 Ct 值 ≤ 30 并出现特异性扩增曲线, 阴性对照无 Ct 值并且无特异性扩增曲线, 实验结果成立; 被检样品若 FAM 荧光信号 Ct 值 ≤ 30 并出现特异性扩增曲线为 PEDV 阳性; 被检样品若 HEX 荧光信号 Ct 值 ≤ 30 并出现特异性扩增曲线为 TGEV 阳性; 被检样品若 CY5 荧光信号 Ct 值 ≤ 30 并出现特异性扩增曲线为 PRV-A 阳性; 被检样品 30 < Ct < 37 并出现特异性扩增曲线, 需重新取样提取 RNA, 扩增后进行结果判定, 如仍是可疑, 可判定为阳性; 被检样品 Ct 值 ≥ 37 时, 超过本方法检测灵敏度范围, 判定为阴性; 对于某些未呈现 S 型曲线, 但本底较高的样品, 应判定为阴性。

【规格】50 头份/盒

【保存及有效期】于 -20℃ 以下保存, 有效期为 12 个月。

【生产企业】哈尔滨元亨生物药业有限公司

【地址】哈尔滨利民开发区珠海路 1 号