

犬腺病毒 PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

犬腺病毒（CAV）的聚合酶链反应（PCR）试验用于检测粪便、唾液、呼吸道分泌物、呕吐物、血清和肺脏、脾脏等组织中的 CAV，适用于 CAV 的检测、诊断和流行病学调查。

【原理】

提取样品 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。经过多次循环，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
阴性对照	350 μ L	1 mL	-20 $^{\circ}$ C
CAV-1 阳性对照	350 μ L	1 mL	
CAV-2 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	
0.2 mL 薄壁 PCR 管	15 个	60 个	
说明书	1 份	1 份	

【需要自备的器材】

1. **试剂：**核酸提取试剂、琼脂糖、电泳试剂等。
2. **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、-20 $^{\circ}$ C 冰箱、可调移液器（2 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L）。
3. **耗材：**称量纸、20 mL 一次性注射器、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。

【使用注意事项】

1. 建议与世纪元亨提供的柱式 DNA 核酸提取试剂盒（含电泳试剂）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，需进行提取，建议提取用量分别为 100 μ L。
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、电泳区。流程顺序为分配液区→模板提取区→扩增区→电泳区。严禁器材和试剂倒流。
5. 所有试剂应在规定的温度储存。-20 $^{\circ}$ C 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，使用后立即放回 -20 $^{\circ}$ C。

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中配制，整个实验过程严格控制污染。
9. 反复冻融试剂将减低检测灵敏度，本试剂盒应在 3 次内用完。

【样品采集】

病死犬，取肺脏、脾脏等组织病变部与健康部交界处组织；待检病犬粪便、鼻咽拭子放于 50% 甘油生理盐水中。2~8 $^{\circ}$ C 保存，送实验室检测。（要求送检病料新鲜，严禁反复冻融病料。）

【PCR 操作】

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

例如：n 份样品，配制 n+1 份，16 $\times$ （n+1）PCR 反应液，再加入 2 $\times$ （n+1）Taq DNA 聚合酶，混匀后取 18 μ L 分装成 n 份，分别加入 2 μ L 模板 DNA，PCR 扩增仪若无热盖则要在管中加矿物油覆盖，作好标记。

在 PCR 扩增仪上进行以下程序：94 $^{\circ}$ C 3 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，58 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 60 s，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

【电泳】

称 3g 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），于微波炉中溶解，再加入 10 μ L 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 μ L，点样于琼脂糖凝胶孔中，以 110~120 V 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】

CAV-1 阳性对照出现 520 bp 扩增带和 CAV-2 阳性对照出现 1030 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 520 bp 扩增带为 CAV-1 阳性，出现 1030 bp 扩增带为 CAV-2 阳性，否则为阴性。

【规格】10 头份/盒 50 头份/盒

【保存及有效期】0.2 mL 薄壁 PCR 管可存放于室温，其他试剂于 -20 $^{\circ}$ C 以下保存，有效期为 6 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