

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

【用途】

用于猪排泄物、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) 的核酸检测。

【检测原理】

利用离心柱内玻璃纤维滤膜提取样品病原 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多次后, 使扩增 DNA 片段放大了数百万倍。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】

组分	名称	数量	贮藏条件
RNA 核酸 提取	裂解液	6 mL	室温
	洗液	12 mL	
	洗脱液	1 mL	
	吸附柱和收集管	10 套	
-20 °C 试剂	反应体系管	10 支	-20 °C
	RNA 内参	300 μL	

【需要自备的物品】

1. 仪器: 涡旋振荡器、离心机、T8 荧光 PCR 扩增仪、-20 °C 冰箱、组织研磨器、可调移液器。
2. 耗材: 眼科剪、眼科镊、生理盐水、经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水处理的灭菌 1.5mL 离心管和吸头。

【操作步骤】

1 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 °C 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

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 全血样品处理: 待血凝后取血清 100 μL, 置 1.5 mL 灭菌离心管中。

3 病毒 RNA 的提取

3.1 将处理好的样品分别加入 20μL RNA 内参, 再加入裂解液 600μL, 充分颠倒混匀, 室温静置 3min。将液体吸入吸附柱中 (吸附柱要套上收集管, 吸入液体时尽量不要吸入悬浮杂质, 以免离心时堵塞吸附柱), 13000 rpm 离心 30 s。

3.2 弃去收集管中液体, 吸取洗液 500 μL 加入吸附柱, 13000 rpm 离心 30 s。

3.3 弃去收集管中液体, 吸取洗液 500 μL 加入吸附柱, 13000 rpm 离心 2 min (拿出时请注意避免吸附柱碰到下面的液体) 以除去残留的洗液。

3.4 将吸附柱移入 1.5 mL 离心管中, 向吸附柱中央加入 50μL 洗脱液, 13000 rpm 离心 30 s, 离心管中液体即为模板 RNA。

4 操作方法

取反应体系管置于室温融化, 用移液器吸取模板 5μL 加入反应体系管中, 用离心机离心 30s, 放入机器中, 使用程序 PEDV&TGEV&PRV-A 进行扩增检测。

【结果判定】

根据自动分析, 内参 CY5 荧光信号 Ct 值 ≤ 30 并出现特定的扩增曲线, 实验结果成立; 被检样品若 FAM 荧光信号 Ct 值 ≤ 30 并出现特定的扩增曲线为 PEDV 阳性; 被检样品若 HEX 荧光信号 Ct 值 ≤ 30 并出现特定的扩增曲线为 PRV-A 阳性; 被检样品若 ROX 荧光信号 Ct 值 ≤ 30 并出现特定的扩增曲线为 TGEV 阳性; 被检样品 30 < Ct < 36 并出现特定的扩增曲线, 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 ≥ 36 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。

【注意事项】

1. 本品仅供体外诊断用。
2. 为确保检测结果准确, 请严格按照说明书操作。
3. 试剂盒内物品均只能使用一次, 请勿重复使用。
4. 抗凝血及粪便样品, 加入吸附柱前, 10000 rpm 离心 30 s。
5. 所有用于检测的废弃物品均应放入含消毒液的废物缸内, 浸泡消毒; 实验结束后立即用 1% 次氯酸钠或 75% 酒精消毒工作台。
6. 实验过程中, 尽量避免手和手套接触吸附柱管口和离心管口, 若离心管开盖时液体粘在手上或溅出, 应立即更换手套; 所有接触病料的物品均应合理处理。
7. 反应体系管用前, 于室温融化, 打开时请左右摇动掰至 45°, 再用劲打开, 避免用力过大将其掰断。
8. 反应体系管加入模板后, 一定要离心, 使液体全部置于管底。
9. 反应体系管使用完后, 用取样器从机器取出时, 插入最后一道棱, 不要将反应体系管打开, 避免污染。

【规格】10 头份/盒

【保存及有效期】反应体系管、RNA 内参于铝箔袋内于 -20°C 避光保存, 有效期为 12 个月。提取试剂于室温保存。

【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