

猫泛白细胞减少症病毒快速实时荧光 PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

用于猫粪便、直肠拭子、血液样品和细胞培养液中猫泛白细胞减少症病毒 (*Feline panleukopenia virus*, FPV) 或猫细小病毒 (*Feline parvovirus*) 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 和 DNA, 以 DNA 为模板, 引物为起点, 合成与 DNA 模板互补的链, 在热启动 Taq 酶的作用下, 经高温变性、中温退火及延伸的多次循环后, 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】

名称	成分	数量	贮藏条件
FPV 反应体系管	扩增反应液	10 支	-20 °C

【需要自备的物品】

1. 仪器: 水浴锅、涡旋震荡器、离心机、V8 实时荧光定量 PCR 仪、-20 °C 冰箱、可调移液器等。
2. 耗材: 板架、吸头。

【操作步骤】

1. 样品采集与制备

- 1.1 用一次性使用拭子蘸取猫的粪便样品 (约 0.1g) 或采取直肠拭子, 再将拭子插入无菌生理盐水采样管中 (多余部分掰断, 盖好盖子), 涡旋震荡混匀, 吸取上清液 200μL 于 RD 消化液管中, 再加入 20μL RD 蛋白酶 K(-20°C), 56°C 水浴 9min, 每 3min 涡旋震荡一次。
- 1.2 EDTA 抗凝血、细胞培养液, 吸取上清液 200μL 于 RD 消化液管中, 再加入 20μL RD 蛋白酶 K(-20°C), 56°C 水浴 9min, 每 3min 涡旋震荡一次。

2. 病毒核酸 (RNA 和 DNA) 的提取 (配套世纪元亨柱式核酸提取试剂盒使用)

- 2.1 向消化过的液体中加入 300μL RD 结合液, 颠倒混匀, 将管中液体吸入吸附柱中 (吸附柱要套上收集管, 吸入液体时尽量不要吸进悬浮杂质, 以免离心时堵塞吸附柱), 10000 rpm 离心 30 s。
- 2.2 弃去收集管中液体, 再吸取 RD 洗涤液 500 μL 加入吸附柱, 10000 rpm 离心 30 s。
- 2.3 弃去收集管中液体, 再吸取 RD 洗涤液 500 μL 加入吸附柱, 10000 rpm 离心 2min (拿出时请注意避免吸附柱碰到下面的液体)。
- 2.4 将吸附柱移入 1.5 mL 离心管中, 吸取 50μL RD 洗脱液加入到吸附柱中央, 10000 rpm 离心 30 s, 离心管中液体即为模板 (RNA 和 DNA)。

3. 操作方法

取反应体系管置室温融化, 须**瞬时离心**后再开盖使用, 用移液器吸取模板 2μL 加入反应体系管中, 使用离心机离心 30s, 放入机器中, 使用程序 FPV 进行扩增检测。

【结果判定】

根据分析, Ct 值 ≤ 36 并出现特异性扩增曲线为 FPV 阳性, Ct 值 > 36 时, 并出现特异性扩增曲线, 需重新取样提取 DNA, 扩增后进行结果判定, 如仍出现特异性扩增曲线, 可判定为阳性; **对于某些未呈现特异性扩增曲线, 但本底较高的样品, 应为阴性。**

【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. 试剂盒中提取耗材和反应体系管只能使用一次, 请勿重复使用。
4. 若无涡旋震荡器, 可用手使劲弹底部, 使液体充分混匀。
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. 蛋白酶 K 用之前, 10000 rpm 离心 30 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 °C。
7. 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, 进行步骤 2.1 时, 若离心管开盖时粘在手上或溅出, 应立即更换手套; 所有接触病料的物品均应合理处理。
8. **抗凝血及粪便样品, 加入吸附柱前, 10000 rpm 离心 30 s, 吸取上清, 勿吸进沉淀。**
9. **进行步骤 2.3 时, 为避免取出吸附柱时碰到下面液体, 建议加入洗涤液后先 10000rpm 离心 30s, 倒掉废液后再套上收集管 10000rpm 空管离心 2min。**
10. 反应体系管用前于室温融化并瞬时离心, 避免开盖时试剂溅出, 打开时避免用力过大将反应体系管盖内颈掰断。
11. 反应体系管加入模板后必须离心, 保证液体全部置于管底。
12. 扩增结束后, 用取样器将反应体系管从机器取出时, 切忌打开反应体系管, 避免气溶胶污染。

【规格】10 头份/盒

【保存及有效期】本品反应体系管于 -20°C 避光保存, 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