

犬瘟热病毒通用型快速实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

用于犬结膜拭子、鼻拭子、咽拭子、气管灌洗样本、组织样本等样品和细胞培养液中犬瘟热病毒（*canine distemper virus*, CDV）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，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 40 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】

名称	成分	数量	贮藏条件
单份核酸提取试剂耗材 (10 套)	一次性棉拭子	1 支	室温
	无菌生理盐水	1 支	
	RD 吸附柱和收集管	1 套	
	RD 消化液	1 支	
	1.5 mL 离心管	1 支	
核酸提取液	RD 结合液	3.6mL	室温
	RD 洗涤液	12 mL	
	RD 洗脱液	1mL	
-20 °C 试剂	反应管	10 支	-20 °C
	RD 蛋白酶 K	1 支	

【需要自备的物品】

1. 仪器：涡旋震荡器、离心机、荧光 PCR 扩增仪、-20 °C 冰箱、可调移液器。
2. 耗材：板架、吸头。

【操作步骤】

1. 样品采集与制备

1.1 将无菌棉拭子用无菌生理盐水沾湿，在结膜囊内或鼻黏膜处翻转涂擦，采集样本，或用无菌拭子蘸取气管灌洗样本。再将拭子插入无菌生理盐水（多余部分掰断，盖好盖子），涡旋震荡混匀，然后将拭子在管壁挤干液体，放入消毒液中弃掉，取上清液 200μL 于 RD 消化液中，再加入 20μL RD 蛋白酶 K(-20°C)，混匀，56°C 水浴 9min，每 3min 涡旋震荡一次。

1.2 EDTA 抗凝血、细胞培养液，取上清液 200μL 于 RD 消化液中，再加入 20μL RD 蛋白酶 K(-20°C)，混匀，56°C 水浴 9min，每 3min 涡旋震荡一次。

2. 病毒核酸 (RNA 和 DNA) 的提取

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，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，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 RD 洗脱液，向吸附柱中央加入 50μL，10000 rpm 离心 30 s，离心管中液体即为模板（RNA 和 DNA）。

3. 操作方法

取反应管置于室温融化，用移液器吸取模板 RNA 5μL 加入反应管中，用离心机离心 30s，放入机器中，使用程序 CDV 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 CDV 阳性；Ct 值 > 36 时，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. 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。
9. 反应管用前，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。
10. 反应管加入模板后，一定要离心，使液体全部置于管底。
11. 反应管使用后，从机器用取样器取出时，插入最后一道棱，不要将反应管打开，避免污染。

【规格】10 头份/盒

【保存及有效期】本品反应管于 -20°C 避光保存，有效期为 12 个月。其它物品于室温保存。

【生产企业】北京世纪元亨动物防疫技术有限公司

地址：北京海淀区北清路 68 号院中区 13 号楼