

# 冠状病毒快速实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒使用说明书

## 【用途】

用于 1) 犬、猫等动物的粪便、直肠拭子等样品 2) 猫胸、腹腔积液、脑脊液、房水、肾肉芽肿等样品中冠状病毒 (Coronavirus, Cov) 的核酸检测。

## 【检测原理】

利用离心柱内特殊的高分子膜提取样品病原 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 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
RNA 单份 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	
	吸附柱和收集管	1 套	
	裂解液	1 支	
	1.5 mL 离心管	1 支	
	洗涤液	12 mL	
	洗脱液	1 mL	
-20 °C 试剂	反应管	10 支	-20 °C

## 【需要自备的物品】

1. 仪器：涡旋振荡器、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 肠道、呼吸道冠状病毒检测：用一次性使用拭子蘸取粪便样品 (约 0.1g) 或采取直肠拭子或鼻、咽拭子，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，取上清液 200 μL 于裂解液管中，颠倒混匀。  
1.2 猫传染性腹膜炎冠状病毒检测：

1.2.1 猫胸、腹腔积液 (湿性)，房水、脑脊液 (干性)，取 200 μL 于裂解液管中，颠倒混匀，室温放置 3min，中间混匀 2 次。  
1.2.2 肉芽肿组织、增大的肠系膜淋巴结组织 (干性) 研磨，待匀浆后转至 1.5 mL 灭菌离心管中，8000 rpm 离心 2 min，吸取上清液 200 μL 于裂解液管中，颠倒混匀。

2. 病毒核酸 RNA 的提取  
2.1 将 1.1 或 1.2 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)，13000 rpm 离心 30 s。  
2.2 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。  
2.3 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。

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

## 3. 操作方法

取反应管置于室温融化，用移液器吸取模板 5 μL 加入反应管中，用离心机离心 30s，放入机器中，使用程序 Cov 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 Cov 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. 试剂盒内物品均只能使用一次，请勿重复使用。
4. 若无涡旋振荡器，可用手使劲弹底部，使液体充分混匀。
5. 抗凝血及粪便样品，加入吸附柱前 10000 rpm 离心 30 s。
6. 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。
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，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 13000 rpm 离心 30s，倒掉废液后再套上收集管 13000 rpm 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