

## A 型流感病毒快速实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒使用说明书

### 【用途】

用于犬、猫、马等动物的鼻、咽拭子、肺脏、气管等样品和鸡胚尿囊液中 A 型流感病毒 (A Influenza virus, A-IV) 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
A-IV 反应体系管	扩增反应液	10 支	-20 °C

### 【需要自备的物品】

1. 仪器: 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: 研磨器、手术剪、板架、吸头。

### 【操作步骤】

#### 1. 样品采集与制备

1.1 将拭子用无菌生理盐水沾湿, 在鼻粘膜或咽喉处翻转涂擦, 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采样管中 (多余部分掰断, 盖好盖子), 涡旋震荡混匀, 取上清液 200 $\mu$ L 于 RD 消化液管中, 再加入 20 $\mu$ L RD 蛋白酶 K(-20 $^{\circ}$ C), 混匀, 56 $^{\circ}$ C 水浴 9min, 每 3min 涡旋震荡一次。

1.2 鸡胚尿囊液, 取上清液 200 $\mu$ L 于 RD 消化液管中, 再加入 20 $\mu$ L RD 蛋白酶 K(-20 $^{\circ}$ C), 混匀, 56 $^{\circ}$ C 水浴 9min, 每 3min 涡旋震荡一次。

1.3 肺脏、气管, 用手术剪剪碎取 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 200 $\mu$ L 于 RD 消化液管中, 再加入 20 $\mu$ L RD 蛋白酶 K(-20 $^{\circ}$ C), 混匀, 56 $^{\circ}$ 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 300 $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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 50 $\mu$ L 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

取反应体系管置于室温融化, 须**瞬时离心**后再开盖使用, 用移液器吸取模板 5 $\mu$ L 加入反应体系管中, 用离心机离心 30s, 放入机器中, 使用程序 A-IV 进行扩增检测。

### 【结果判定】

根据自动分析, Ct 值 $\leq$ 36 并出现特异性扩增曲线为 AIV 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  $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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