

## 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
RNA 单份提取试剂耗材 (10 套)	一次性棉拭子	1 支	室温
	无菌生理盐水采样管	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℃试剂	COV 反应体系管	10 支	-20℃

### 【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℃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 肠道冠状病毒检测: 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采样管中 (多余部分掰断, 盖好盖子), 涡旋震荡混匀, 取上清液 200μL 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 200μL 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 200μL 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, 吸取洗涤液 500 μL 加入吸

附柱, 13000 rpm 离心 30 s。

2.3 弃去收集管中液体, 吸取洗涤液 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 50μL 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 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 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】

- 本品仅供体外诊断用。
- 为确保检测结果准确, 请严格按照说明书操作。
- 试剂盒内物品均只能使用一次, 请勿重复使用。
- 若无涡旋震荡器, 可用手使劲弹底部, 使液体充分混匀。
- 抗凝血及粪便样品, 加入吸附柱前 10000 rpm 离心 30 s。
- 所有用于检测的废弃物均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。
- 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。
- 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 13000rpm 离心 30s, 倒掉废液后再套上收集管 13000rpm 空管离心 2min。
- 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。
- 反应体系管加入模板后必须离心, 保证液体全部置于管底。
- 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℃ 避光保存, 有效期为 12 个月。其它物品于室温保存。

【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