

狂犬病病毒巢式 RT-PCR 检测试剂盒说明书

兽用

【兽药名称】

通用名 狂犬病病毒巢式 RT-PCR 检测试剂盒

商品名 无

英文名 Rabies Virus Nested RT-PCR Detection Kit

汉语拼音 Kuangquanbing Bingdu Chaoshi RT-PCR Jianceshijhe

【主要成分与含量】

名称	10 头份	50 头份	贮藏条件
0.2 mL 薄壁 PCR 管	15 个	60 个	室温 (A 盒)
吸附柱和收集管	10 套	50 套	
裂解液	6mL	30mL	
洗液	12mL	60mL	
洗脱液	1mL	10mL	
矿物油	300 μ L	1.2 mL	
50 倍 TAE 电泳缓冲液 (50 倍稀释后使用)	20 mL	100 mL	
染色液	20 μ L	50 μ L	
上样缓冲液	50 μ L	250 μ L	-20 $^{\circ}$ C (B 盒)
阳性对照	350 μ L	600 μ L	
阴性对照	350 μ L	1mL	
RT-PCR 反应液	260 μ L	1.5mL	
PCR 反应液	320 μ L	1.5mL	
酶混合液	40 μ L	180 μ L	
无核酸酶水	600 μ L	1.5mL	

【作用与用途】 用于疑似狂犬病犬脑组织样品中狂犬病病毒 RNA 的检测。

【用法与判定】

1 用法

1.1 待检样品采集、保存及运输

1.1.1 采集部位 取待检犬的脑组织。

1.1.2 采集方法 对犬脑组织标本的采集使用快速采样法，即：用塑料管从头部枕骨大孔或能看见脑组织的位置向眼眶处斜插（或用粗穿刺针从眼角眶向头部枕骨大孔处斜插），然后阻断塑料管尾部与外界大气连通，迅速将塑料管拔出。尽量使塑料管通过犬脑的大脑、中脑和小脑部位。取出的塑料管中应有脑组织；将脑组织标本放入无菌离心管中，记录编号后保存待检。

1.1.3 样品保存 所有待检疑似狂犬病标本在 2~8 $^{\circ}$ C 保存应不超过 24 小时；在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存应不超过 6 个月；长期保存时，以 -70 $^{\circ}$ C 以下冰柜为宜。

1.1.4 样品运输 标本一定要放置在有干冰或冰块的冷藏包中，保持全程冷链运输。要求在运输至实验室时，干冰仍覆盖标本或冰仍未完全融化。

1.2 样品处理

1.2.1 组织样品处理 分别从待检脑组织脑干、小脑及海马回三个不同的部位各称取样品约 1 克，用手术剪剪碎混匀，再取其中约 1 克于研磨器中研磨，加入 1mL 生理盐水继续研磨，取 100 μ L 匀浆液于 1.5mL 灭菌离心管中。

1.2.2 阳性对照样品处理 取阳性对照样品 100 μ L，置 1.5mL 灭菌离心管中。

1.2.3 阴性对照样品处理 取阴性对照样品 100 μ L，置 1.5mL 灭菌离心管中。

1.3 样品总 RNA 的提取

1.3.1 取已处理的样品、阴性对照样品和阳性对照样品，分别加入裂解液 600 μ L，充分颠倒混匀，室温静置 3~5 分钟。

1.3.2 将液体吸入吸附柱中（吸附柱要套上收集管，吸取液体时尽量不要吸到悬浮杂质，以免离心时堵塞吸附柱），以 13000r/min 离心 30 秒，弃去收集管中液体，套上收集管。

1.3.3 向吸附柱中加入 600 μ L 洗液，以 13000r/min 离心 30 秒，弃去收集管中液体，套上收集管。

1.3.4 重复步骤 1.3.3。

1.3.5 再空柱以 13000r/min 离心 2 分钟。

1.3.6 将吸附柱移入新的 1.5mL 离心管中，在膜中央悬空加入洗脱液 50 μ L，室温静置 1 分钟，以 13000r/min 离心 30 秒，洗脱液即为总 RNA。

1.4 扩增操作

1.4.1 第一次扩增 设被检样品、阴性对照样品和阳性对照样品的份数总和为 N，按如下反应体系配制：

RT-PCR 反应液 $22 \times (N+1) \mu\text{L}$

酶混合液 $3 \times (N+1) \mu\text{L}$

将以上配制的反应体系充分混匀后，分装至每个反应管中各 25 μ L。

分别取 1.3.6 中已溶解的样品总 RNA 25 μ L 加入相应反应管中，做好标记。在 PCR 扩增仪上进行以下反应，反应程序为：反转录条件为 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 分钟，95 $^{\circ}\text{C}$ 3 分钟；扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 40 秒，56 $^{\circ}\text{C}$ 45 秒，72 $^{\circ}\text{C}$ 90 秒，30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 分钟。

1.4.2 第二次扩增

PCR 反应液 $27 \times (N+1) \mu\text{L}$

无核酸酶水 $22 \times (N+1) \mu\text{L}$

分装至每管中各 49 μ L，每管分别加入 1 μ L 第一次扩增产物（1.4.1 的扩增产物），做好标记。在 PCR 扩增仪上进行以下反应，反应程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 3 分钟；扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 40 秒，56 $^{\circ}\text{C}$ 45 秒，72 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒，30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 分钟后，结束反应。

1.5 电泳 称 3g 琼脂糖放于 500 mL 锥形瓶中，加入 50 倍稀释的 TAE 电泳缓冲液 200 mL（取 4 mL 50 倍 TAE 电泳缓冲液，用双蒸水稀释至 200 mL），于微波炉中溶解，再加入 10 μ L 染色液混匀。在电泳槽内放好梳子，倒入琼脂糖凝胶，待凝固后将第二次 PCR 扩增产物 10 μ L，点样于琼脂糖凝胶孔中，以 110~120V 电压于 50 倍稀释的 TAE 电泳缓冲液中电泳，紫外灯下观察结果。

2 结果判定 阳性对照样品出现 255bp 扩增带、阴性对照样品无带出现（引物带除外）时，实验结果成立。被检样品出现 255bp 扩增带判为狂犬病病毒阳性，否则判为阴性。

【注意事项】

- 1) 本试剂盒只用于疑似狂犬病犬脑组织样品的检测，不适用于唾液、血清、尿液等样品。
- 2) 狂犬病样品的采集应由专业的技术人员完成，避免因样品采集不当而影响实验结果，鉴于待检病料可能含有感染性病毒，要

求检验人员必须接受狂犬病暴露前免疫。

- 3) 所有试剂应在规定的温度储存。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存的各试剂管使用前应完全融化，8000 rpm 离心 15 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，使用后应立即放回 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 4) 所有用于检测的废弃物均放入含消毒液的废物缸内，高压灭菌处理。
- 5) 实验室应分配液区、模板提取区和扩增区。工作流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区。各区器材试剂专用，不可跨区使用。实验结束后立即用 1% 次氯酸钠或 75% 酒精消毒工作台。
- 6) 染色液低毒，操作时应戴上手套，避光保存，较长时间不使用请存放于 4 $^{\circ}\text{C}$ ，以免挥发变干。**染色液和上样缓冲液使用前也请离心使液体沉于管底。**
- 7) 在提取 RNA 时，尽量缩短操作时间，避免 RNA 酶污染。离心管、吸头等在实验前应全部高压灭菌。用灭菌的镊子夹取离心管，打开和盖上离心管盖时避免手和手套接触离心管口，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) 提取的 RNA 样品，短期内使用放置于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 或冰上，长期应在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。
- 9) 反应体系在特定配液区或者超净工作台中配制，配制和分装 RT-PCR 反应液、PCR 反应液时应尽量避免产生气泡，上机前检查各反应管是否盖紧。
- 10) 反复冻融试剂将降低检测灵敏度，建议在 3 次内用完，请严格按试剂盒说明书操作。

【贮藏与有效期】 RT-PCR 反应液、PCR 反应液、酶混合液、无核酸酶水、阳性对照样品和阴性对照样品 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。其他成分室温保存。有效期为 12 个月。