

水貂冠状病毒荧光 RT-PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time RT-PCR for the detection of Coronavirus

(50 reactions)

1、试剂盒简介

货号：HB-402

水貂冠状病毒是水貂冠状病毒性肠炎（水貂流行性腹泻）的致病病原，由冠状病毒感染引起的水貂腹泻是继水貂细小病毒性肠炎之外导致水貂腹泻的又一重要病毒性传染病，又称水貂流行性卡他性胃肠炎（ECG）。本试剂盒研发的引物探针的 5'端和 3'端分别标记不同的荧光素，如 5'端标记 CY5 荧光素，3'端是 BHQ2 修饰。

2、试剂盒组成

试剂盒组成包括核酸扩增试剂。具体组成参见表 1：

表 1：试剂盒组成（50test/盒）

试剂盒组成成分	体积
核酸扩增试剂：	
DEPC 水	1ml × 1 管
冠状病毒荧光 RT-PCR 反应液	750 μL × 1 管
酶混合物	60 μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
荧光阳性对照	1ml × 1 管

（注：推荐使用提取核酸更快捷方便的《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》）

3、样本采集、存放及运输

3.1 样本采集：所用取样器材必须经高压灭菌并烘干。

用于检测多种样本（如肌肉、脏器、咽喉拭子/泄殖腔拭子、血清或血浆、组织渗出液等）中冠状病毒的 RNA。

3.2 存放：样品应尽快研磨提取核酸进行检测，-70 °C 以下可长期保存，但应避免反复冻融。

3.3 运输：采用冰壶或泡沫箱加冰密封进行运输。

4、荧光 RT-PCR 检测

4.1 操作方法

4.1.1 样本的处理（在样本制备区进行）：

4.1.1.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和（阳性对照、阴性对照在试剂盒中已标出），做标记。

4.1.1.2 每管加入 600 μL 裂解液，分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各 200 μL，一份样本换用一个吸头，再加入 200 μL 氯仿，混匀器上振荡混匀 5 s（不能过于强烈，以免产生乳化层，也可以用手颠倒混匀），于 4°C 12 000 r/min 离心 15 min。

公司地址：北京市顺义区南法信顺畅大道 14 号院东亚首航国际 1 号楼 3 层 329 室

公司网址：www.halcyonbio.com

电 话：13718421576

邮 箱：haisentong@126.com

客服 QQ：737481857

- 4.1.1.3 取与 4.1.1.1 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，加入 500 μL 异丙醇 (-20°C 预冷)，做标记。吸取 4.1.1.2 各管中的上清液转移至相应的管中，上清液应至少吸取 500 μL ，不能吸出中间层，颠倒混匀。
- 4.1.1.4 于 4°C 、12 000 r/min 离心 15 min (Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置)，小心倒去上清，倒置于吸水纸上，沾干液体 (不同样品须在吸水纸不同地方沾干)；加入 600 μL 75% 乙醇，颠倒洗涤。
- 4.1.1.5 于 4°C 、12 000 r/min 离心 10 min (Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置)，小心倒去上清，倒置于吸水纸上，尽量沾干液体 (不同样品须在吸水纸不同地方沾干)。
- 4.1.1.6 4 000 r/min 离心 10s (Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置)，将管壁上的残余液体甩到管底部，小心倒去上清，用微量加样器将其吸干，一份样本换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面，室温干燥 3 min，不能过于干燥，以免 RNA 不溶。
- 4.1.1.7 加入 33 μL DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2 000 r/min 离心 5 s，冰上保存备用。提取的 RNA 须在 2 h 内进行 PCR 扩增；若需长期保存须放置 -70°C 冰箱内。

【推荐使用《《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》》，更方便快捷高效提取核酸】。

注：提取的 RNA 须在 2 h 内进行 PCR 扩增；若需长期保存须放置 -70°C 冰箱内。

4.1.2 检测

4.1.2.1 扩增试剂准备 (在反应混合物配制区进行)：

从试剂盒中取出相应的荧光 RT-PCR 反应液、酶混合物，在室温下融化后，2000 r/min 离心 5 s。设所需荧光 RT-PCR 检测总数为 n，其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和，每个样品测试反应体系配制见表 2：

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	RT-PCR 反应液	酶混合物
用量	15 μL	1.0 μL

根据测试样品的数量计算好各试剂的使用量，加入到适当体积试管中，充分混合均匀，向每个荧光 RT-PCR 管中各分装 15 μL ，转移至样本处理区。

4.1.2.2 加样 (样本处理区进行)：

在各设定的荧光 RT-PCR 管中分别加入上述样本处理步骤 4.1.1.7 中制备的 RNA 溶液各 10 μL ，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。

4.1.2.3 荧光 RT-PCR 检测 (在检测区进行)：

将 4.1.2.2 中离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

循环条件设置：

第一阶段，反转录 $42^{\circ}\text{C}/30\text{ min}$ ；

第二阶段，预变性 $94^{\circ}\text{C}/3\text{ min}$ ；

第三阶段， $94^{\circ}\text{C}/15\text{ sec}$ ， $60^{\circ}\text{C}/30\text{ sec}$ 共 40 个循环。荧光收集在第三阶段每次循环的 60°C 延伸时进行。

试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

4.2 结果判定

4.2.1 结果分析条件的设定 阈值设定原则：根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过阴性对照品扩增曲线的最高点为准。对于多通道荧光 PCR 仪，选定 CY5 检测通道读取检测结果，3' 端选择无荧光标记淬灭基团。

4.2.2 质控标准

a) 阴性对照无 Ct/Cp 值并且无扩增曲线。

公司地址：北京市顺义区南法信顺畅大道 14 号院东亚首航国际 1 号楼 3 层 329 室

公司网址：www.halcyonbio.com

电话：13718421576

邮箱：haisentong@126.com

客服 QQ：737481857

- b) 阳性对照的 Ct/Cp 值应小于等于 28，并出现典型的扩增曲线。
- c) 如阴性和阳性对照不满足以上条件，此次实验视为无效。

4.2.3 结果判定

- a) 阴性：无 Ct/Cp 值，且无特征性扩增曲线，表明样品为阴性。
- b) 阳性：Ct/Cp 值 \leq 30.0，且出现典型的扩增曲线，表示样品为阳性，含有冠状病毒核酸。
- c) Ct/Cp 值大于 30.0，且出现典型的扩增曲线的样品建议复验。复验仍出现上述结果的，判为阳性，否则判为阴性。

【注意事项】

1. 实验室应至少分三个区：样品处理区、反应混合物配制区和检测区。
2. 各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染。检测结束后，应立即对工作台进行清洁。
3. 分装反应液时，应尽量避免产生气泡。上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
4. 阳性对照在吸取前应在微量漩涡振荡器上剧烈振荡 1~2 秒。
5. 试剂盒中各组分应避免反复冻融。

【规格】 50 份/盒

【贮藏与有效期】 荧光 RT-PCR 检测试剂盒-20℃保存，有效期为 12 个月；《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》室温保存。