



# 犬冠状病毒 RT-PCR 试剂盒

## 产品及特点:

犬冠状病毒(Canine coronavirus, CCV)为单链 RNA 病毒,有 6~7 种多肽,其中 4 种是糖肽,不含 RNA 聚合酶及神经氨酸酶。可使犬发生程度不同的胃肠炎症状,特征有频繁呕吐、腹泻、沉郁、厌食等症状。本病一年四季均可发生,以冬季多发,病犬是主要的传染原,犬可通过呼吸道、消化道、粪便及污染物传染。该病一但发生,同窝犬同室犬很难控制均可造成感染。幼犬死亡率较高,对幼犬的危害较大。最近的研究发现,CCV 感染的宿主范围有不断扩大的趋势,许多野生动物如虎、狮、大熊猫、小熊猫、水貂也可感染。所以对犬呼吸道病毒的快速准确检测与鉴定具有重要的临床意义。本产品根据 RT-PCR 原理开发,

1. 一站式,用户不需要单独准备每种成分,包括引物和对照。
2. 根据犬冠状病毒的保守基因序列设计的引物,具有良好的特异性。
3. 灵敏度可以达到 1000 拷贝/反应。
4. 使用一管式 RT-PCR 技术,RT 和 PCR 两步在一个试管内完成,不需要中间转移样品,降低了操作误差和可能的污染。
5. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的 RT-PCR。
6. 本产品只能用于科研,不能用于临床。

## 规格及成分:

编号	成分	规格
试剂一	5 $\times$ 双酶一管式 RT-PCR Buffer	200 $\mu$ L (橘黄盖)
试剂二	MMLV-Taq Mix	75 $\mu$ L (红盖)



试剂三	超纯水	1 mL (亮黄盖)
试剂四	犬冠状病毒 RT-PCR 引物混合液	100 $\mu$ L (白盖)
试剂五	犬冠状病毒 RT-PCR 阳性对照 ( $1 \times 10^8$ / $\mu$ L)	50 $\mu$ L (黄盖)
试剂六	使用手册	1 份

**注** 为避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供专一的 DNA 片段作为阳性对照。

## 运输及保存:

低温运输,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存, 保存期限为 12 个月。收到货后阳性对照需要跟其他成分分开放置, 因为其容易污染其他成分, 造成假阳性。

## 自备试剂:

样品 RNA。

## 使用方法:

### 一、样品 DNA 的制备:

1. 如果有 N 个样品, 必须设置 N+2 个提取, 多出的一个是 PC (样品制备阳性对照), 一个是 NC (样品制备阴性对照)。可以用 10 $\mu$ L 犬冠状病毒 PCR 阳性对照的 1000 倍稀释液作为制备的阳性对照。可以用水作为制备的阴性对照。制备所得成为样品 RNA。
2. 用自选方法纯化 N+2 个样品的 RNA, 本试剂盒跟市场上大多数病毒 RNA 提取试剂盒兼容。可以选购本公司的柱式病毒 RNAout。

### 二、设置 RT-PCR 反应(20 $\mu$ L 体系):

3. 如果有 N+2 个样品, 则标记 N+4 个 PCR 管(额外增加的两个管一个是 RT-PCR 阳性对照, 另一个是 RT-PCR 阴性对照)并按照下表在 PCR 管中加入下列成分:



成份	N+2 个 样品管	RT-PCR 阴性对照	RT-PCR 阳性对照
5×双酶一管式 RT-PCR Buffer	各 4 μL	4 μL	4 μL
犬冠状病毒 RT-PCR 引物混合液	各 2 μL	2μL	2μL
N+2 个制备的 RNA 样品	各 12.5μL	--	--
超纯水	--	12.5μL	--
犬冠状病毒 RT-PCR 阳性对照的 1000 倍稀释液	--	--	12.5μL
MMLV-Taq Mix	1.5 μL	1.5 μL	1.5 μL

#### 4. 上机进行 RT-PCR, RT-PCR 反应参数为:

过程	温度	时间
逆转录	42°C	30 min
预变性	95°C	5 min
PCR 反应 35 个循环	95°C	30 sec
	58°C	30 sec
	72°C	20 sec
最后延伸	72°C	7 min

### 三、电泳检测:

5. 琼脂糖电泳检测扩增效果。如果阴性对照有扩增产物或阳性对照无扩增产物, 则说明实验失败, 需要分析实验失败的原因。只有在阴性对照没有扩增产物、阳性对照必须有预期条带出现, 才有必要分析样品的实验结果, 如果有预期片段大小的扩增产物则为阳性, 如果无则为阴性。



上海纪宁实业有限公司([www.shjning.com](http://www.shjning.com))所有产品仅供科研使用, 不得用于其他用途。