

# 非洲猪瘟病毒DNA荧光PCR检测试剂盒

## 产品组成

非洲猪瘟病毒 DNA 荧光 PCR 检测试剂盒	48 次
Cat. No.	7808048
反应液 A	1 ml
反应液 B	1 ml
PCR 反应条	6 条 (8 管/条)
阴性对照	50 $\mu$ l
阳性对照	50 $\mu$ l
说明书	1 份

## 产品储存与有效期

试剂请保存于  $-20^{\circ}\text{C}$ ，不宜反复冻融，使用前应在室温下完全融化，并充分震荡混匀后稍事离心；有效期为十二个月。

## 产品介绍

本试剂盒利用一对非洲猪瘟病毒 DNA 的特异性引物，一条特异性荧光探针，采用耐热 DNA 聚合酶 (Taq 酶)、四种单体核苷酸 (dNTPs) 等成分，并应用 PCR 技术实现对非洲猪瘟病毒 DNA 保守基因的扩增，实现从猪血清或组织匀浆液上清中检测非洲猪瘟病毒 DNA。

## 用户需自备的试剂与物品

- 1.5 ml 离心管
- 移液器及吸头 (为避免样品间的污染，请选用含有滤芯的移液器吸头)
- 一次性手套及防护用品和纸巾
- 台式小量离心机或掌上离心机 (可配离心 1.5 ml 离心管和八联管的转子)
- 本试剂盒适用于荧光 PCR 检测仪。

## 注意事项

- 实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按照操作步骤执行，在操作过程中对时间、试剂体积等精确控制可以获得最好的结果。
- 核酸处理的有关耗材确保洁净、无 DNase/RNase，操作过程尽量低温、快速，完成后进入下一步实验或冻保。
- 对于顶部采光仪器要带新的一次性 PE 手套对荧光 PCR 管封盖，对于底部采光仪器要避免徒手或使用过的手套接触荧光 PCR 管底，检测过程中使用不带荧光物质的一次性乳胶手套。
- 冻存试剂使用前应于室温下完全融化，混匀后稍事离心使液体完全沉于管底，吸头尽量在液体表层吸取，使用后立即放回  $-20^{\circ}\text{C}$ 。建议避免反复冻融，以免影响试剂性能。
- 样品、阳性对照等在使用后及时封盖，避免组分间及气溶胶等的污染造成假阳性。
- 实验产生的废弃物应及时收集，远离 PCR 实验室进行无害化处理。

## 操作步骤:

### 1. 待检样品采集、保存及运输

- (1) 样品采集: 采集脾脏、肝脏、淋巴结、扁桃体等组织; 待检活畜, 采集血液。
- (2) 样品保存: 采集的样品在2~8℃保存应不超过1周, -70℃条件下保存, 避免反复冻融。
- (3) 样品运输: 泡沫箱加冰袋后密封进行运输。

### 2. 样品处理

- (1) 组织: 取100~200 mg (约黄豆粒大小) 怀疑感染有病毒的组织 (淋巴结、脾脏、扁桃体、肌肉等) 放入研钵, 加入1~2 ml生理盐水, 研磨成匀浆液, 室温静置5~10分钟, 吸取顶部较清澈的组织悬浮液用于检测。
- (2) EDTA抗凝管采集的血液: 静置采血管约1小时, 直接吸取上层血浆, 或者将血液低速离心数分钟, 吸取上层血浆用于检测。
- (3) 无抗凝剂的采血管: 吸取血清用于检测。  
取5 μl血浆/血清/组织匀浆液上清加入RNase/DNase-free 1.5 ml离心管中, 加入20 μl反应液A, 混匀, 室温(20℃左右)静置3分钟, 再加入20 μl反应液B, 混匀后低速离心数秒使液体完全沉降于管底, 即为待检核酸DNA溶液。

### 3. 荧光PCR反应

- (1) 计算当次实验所需要的反应数 (每次实验需预留2管做阳性对照和阴性对照), 从冰箱取出试剂盒中的PCR反应条 (内含PCR反应缓冲液和酶液), PCR反应条中的白色成分为隔离剂, 室温条件下不溶, 待隔离剂下层溶液融化 (室温约5分钟), 用掌上离心机瞬时离心, 将PCR反应管转移至样本处理区。
- (2) 取5 μl待检核酸DNA溶液加入PCR反应管侧壁, 切勿将吸头插入隔离剂中。在预留的阳性对照管中加入5 μl阳性对照品, 在预留的阴性对照管中加入5 μl阴性对照品, 终体积25 μl/管。盖好荧光PCR反应管盖, 用掌上离心机瞬时离心, 转移到荧光PCR仪器上。
- (3) 将PCR反应管放置在荧光PCR仪中, 在荧光PCR仪上运行以下程序:

步骤	条件	循环数
UNG 处理	50℃: 2 分钟	1
预变性	95℃: 1 分钟	1
PCR 扩增	95℃: 15 秒    60℃: 35 秒	40

荧光通道选择 FAM, 在 PCR 扩增阶段每个循环的 60℃时采集荧光信号。设置扩增体系为 25 μl, 同时要选  
择 passive reference 和 quencher 为 none 的模式。

### 4. 结果分析:

- (1) 阈值设定: 阈值设为 500 (ABI、Roche、Bio-Rad、Agilent Technologies 等进口仪器  
无需设置)。
- (2) 质量控制:  
阳性对照: 有典型扩增曲线且 Ct 值≤35。  
阴性对照: Ct 值>38或无 Ct 值, 线形为直线或轻微斜线, 无指数增长期。
- (3) 样品判定:  
阳性: 标本检测结果 Ct 值≤35 或有明显指数增长期, 判定检出非洲猪瘟病毒 DNA。  
可疑: 标本检测结果 Ct 值在 35~38 范围内。此时应对标本进行重复检测, 如果重复实验结  
果 Ct 值仍在 35~38 范围内, 有明显指数增长期, 则判定为阳性, 否则为阴性。  
阴性: 标本检测结果 Ct 值>38 或无 Ct 值, 判定未检出非洲猪瘟病毒 DNA。