

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 μ l
阳性对照	50 μ l
说明书	1 份

产品储存与有效期

试剂请保存于 -20℃，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。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

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. 1.5 ml 离心管
2. 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）
3. 一次性手套及防护用品和纸巾
4. 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）
5. 本试剂盒适用于荧光 PCR 检测仪。

注意事项

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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℃。建议避免反复冻融，以免影响试剂性能。
5. 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。
6. 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 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。