

非洲猪瘟病毒荧光定量 PCR 快速检测试剂盒说明书

(2.0)

兽用

【兽药名称】

通用名称：非洲猪瘟病毒荧光定量 PCR 快速检测试剂盒（2.0）

商品名称：无

英文名称：African swine fever virus Real-time PCR rapid test kit（2.0）

汉语拼音：Feizhouzhuwen Bingdu Yingguangdingliang PCR Kuaisu Jiance Shijihe（2.0）

【主要成分与含量】

编号	试剂盒组分	装量
E 01-q 50	酶反应液	1000 μ l/管
ASFV 02-q2.0 50	引物探针	1 管
ASFV -qPC 50	阳性对照	500 μ l/管
NC	阴性对照	500 μ l/管

【作用与用途】 用于猪血液、脾脏、淋巴结、肾脏组织样品中的非洲猪瘟病毒核酸的检测。

【用法与判定】

1 用法

1.1 样品处理

采用 DNA 提取试剂盒或自动核酸提取仪提取各类样品中的待检 DNA，低温保存。

1.2 扩增试剂准备

1.2.1 将引物探针（棕色管）和酶反应液瞬时离心后，将酶反应液全部移至引物探针（棕色管）中，颠倒混匀 6 次，充分混匀，配制成 PCR 反应液。

1.2.2 根据检测样品数量每个 PCR 反应管加入 20 μ l PCR 反应液；先取 5 μ l 阴性对照、再取 5 μ l 待检 DNA、最后取 5 μ l 阳性对照（充分混匀）分别加到不同的 PCR 反应管中，加样结束后应盖紧 PCR 反应管，每个 PCR 反应管内液体的体积为 25 μ l。

1.3 PCR 反应 加样后将 PCR 反应管瞬时离心，然后置于荧光 PCR 仪内，进行如下反应：

1) 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 分钟；2) 95 $^{\circ}$ C 预变性 20 秒；3) 95 $^{\circ}$ C 变性 10 秒，60 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒，共 40 个循环；设置 60 $^{\circ}$ C 收集 FAM 和 VIC/HEX 荧光信号。

2 判定

2.1 结果的有效性

2.1.1 单次试验的有效性 每次检测试验的阳性对照 FAM 和 VIC/HEX 通道均应出现特异性扩增曲线且 Ct 值 <35 , 阴性对照 FAM 和 VIC/HEX 通道均无特异性扩增曲线或无 Ct 值, 则试验成立, 否则试验不成立。

2.1.2 单管反应的有效性 每个样品反应管的 VIC/HEX 通道 Ct 值 ≤ 37 则该反应污染, 该反应管检测不成立; 当 $37 \leq \text{Ct 值} < 40$ 时, 可能存在污染; Ct 值 ≥ 40 或无特异性扩增曲线则该反应管检测成立。

2.2 结果判定 应结合 FAM 通道和 VIC/HEX 通道进行判定: 在单次试验有效的前提下, 单管反应有效时, FAM 通道 Ct 值 < 40 , 则判为阳性; FAM 通道 Ct 值 ≥ 40 或无特异性扩增曲线, 则判为阴性。当单管反应可能存在污染时, FAM 通道 Ct 值 ≤ 35 , 则判为阳性。其他情况均为可疑, 需重新采样进行检测, 两次可疑判为阳性; 详见下表。

通道	Ct 值	FAM		
		≤ 35	< 40	≥ 40 或无
VIC/HEX	≤ 37	污染	污染	污染
	$37 \leq \text{Ct 值} < 40$	阳性	可疑	可疑
	Ct 值 ≥ 40 或无	阳性	阳性	阴性

【注意事项】 (1) 使用本试剂盒的实验室应严格按照国家有关规定进行管理。

(2) 酶反应液、引物探针配制成的 PCR 反应液对温度敏感容易失活, 使用时应置于冰上, 使用后应立即冻存, 每盒反应液冻融次数不宜超过 3 次。

(3) 扩增试剂准备时应按阴性对照、待检核酸、阳性对照的顺序加入 PCR 反应管中。

(4) 吸取反应液时, 应尽量避免产生气泡; 加样结束后应盖紧反应管, 以免液体蒸发造成结果不准确。

(5) 处理样品用器械及废弃物品应高压灭菌。检测过程中使用过的吸头, 应直接打到盛有 10% 84 消毒液的带盖废物缸内。检测结束的 PCR 反应管, 严禁开盖不得高压处理。

(6) 工作台及各种实验用品应定期清洁并用 10% 84 消毒液或紫外灯进行防污染处理。

(7) 各区域物品均为专用, 不得交叉使用, 以免污染。检测结束后, 应立即对工作台进行清洁。

(8) 严禁使用超过有效期限的试剂; 不同批号的试剂请勿混用。

【规格】 50 检份/盒

【贮藏与有效期】 -20°C 以下冷冻保存, 有效期 15 个月。

仅供兽医诊断使用