

非洲猪瘟病毒荧光定量 PCR 快速检测试剂盒说明书

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

商品名称：无

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

汉语拼音：Feizhouzhuwen Bingdu Yingguangdingliang PCR Kuaisu Jiance Shijihe

【主要成分与含量】

编号	试剂盒组分	装量	
		50 检份	100 检份
ASFV B1-qf	缓冲液 B1	5ml/瓶	10ml/瓶
ASFV B2-qf	缓冲液 B2	5ml/瓶	10ml/瓶
E 01-q50	酶反应液	1000 μ l/管	1000 μ l/管 \times 2
ASFV 02-qf50	引物探针	1 管	2 管
ASFV -qPC50	阳性对照	500 μ l/管	500 μ l/管
NC	阴性对照	500 μ l/管	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

1.1.1 全血、血清、血浆直接进行下一步试验。淋巴结、脾脏、肾脏、扁桃腺、肌肉等组织样品取 0.1~0.2g（黄豆粒大小）加入 10 倍体积约 1~2ml 生理盐水，采用不同方法制成组织匀浆液。

1.1.2 根据待检样品数量，取 1.5ml 离心管依次加入 100 μ l 缓冲液 B1（**恢复至室温并混匀使用**），然后再加入 10 μ l 全血（EDTA 抗凝剂）或 20 μ l 组织匀浆液、血清、血浆样品混匀，室温 3 分钟内涡旋混匀 3~5 次。

1.1.3 向上述混合液中加入 100 μ l 缓冲液 B2（**恢复至室温并混匀使用**），涡旋混匀，12000 转/分钟离心 1 分钟，上清为 PCR 待检核酸；如在 2 小时内检测则 PCR 待检核酸置于 4 $^{\circ}$ C 保存，否则置于 -20 $^{\circ}$ C 以下保存。

1.1.4 肉骨粉、血粉或环境样品等可使用病毒基因组提取试剂盒进行提取，然后再进行下一步试验。

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 18 μ l PCR 反应液；先取 2 μ l 阴性对照、再取 2 μ l 待检 DNA、最后取 2 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 20 μ l。

1.3 荧光 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) 95 $^{\circ}$ C 预变性 20 秒；2) 95 $^{\circ}$ C 变性 10 秒，58 $^{\circ}$ C 延伸 20 秒，共 40 个循环；设置 58 $^{\circ}$ C 收集 FAM 荧光信号。

2 判定

2.1 结果的有效性 阳性对照应出现特异性扩增曲线且 Ct 值 < 35，且阴性对照无特异性扩增曲线或无 Ct 值，则试验成立；否则试验不成立。

2.2 结果判定 当样品的扩增结果有典型的扩增曲线且 Ct 值 < 40 时可判定为非洲猪瘟病毒核酸阳性，Ct 值 < 30 时可判定为非洲猪瘟病毒核酸强阳性；当样品的扩增结果无 Ct 值或背景信号之下时，判定为非洲猪瘟病毒核酸阴性。

【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、引物探针配置成的 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) 缓冲液 B1、B2 使用前融化恢复至室温并充分摇匀，融化恢复至室温的缓冲液 B1、B2 可室温保存。

(4) 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。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 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。

(8) 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。

(9) 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】 (1) 50 检份/盒 (2) 100 检份/盒

【贮藏与有效期】 -20 $^{\circ}$ C 以下冷冻保存，有效期 15 个月。

仅供兽医诊断使用