

非洲猪瘟病毒荧光 PCR 检测试剂盒操作规程

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 μl PCR 反应液；先取 5 μl 阴性对照、再取 5 μl 待检 DNA、最后取 5 μl 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 μl 。

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 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 分钟；2) 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 20 秒；3) 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 秒，60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 秒，共 40 个循环；设置 60 $^{\circ}\text{C}$ 收集 FAM、VIC 与 Cy5 荧光信号。

2 判定

2.1 结果的有效性

2.1.1 FAM 信号、VIC 信号和 Cy5 信号通道下，阳性对照同时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

2.2.1 非洲猪瘟病毒 p72 基因 FAM 信号通道下样品的扩增结果有典型的扩增曲线且 Ct 值 ≤ 38 时可判定为非洲猪瘟病毒 p72 基因阳性；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 p72 基因阴性；当样品的扩增结果有典型的扩增曲线且 $38 < \text{Ct 值} < 40$ 时，可判定为非洲猪瘟病毒 p72 基因可疑，对可疑样品再进行 1 次复检，做 3 个重复反应，若 2 或 3 个重复反应的 Ct 值 < 40 ，且出现典型的扩增曲线，可判定为非洲猪瘟病毒 p72 基因阳性，其它结果判为非洲猪瘟病毒 p72 基因阴性。

2.2.2 非洲猪瘟病毒 CD2v 基因 VIC 信号通道下样品的扩增结果有典型的扩增曲线且 Ct 值 ≤ 38 时可判定为非洲猪瘟病毒 CD2v 基因阳性；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 CD2v 基因阴性；当样品的扩增结果有典型的扩增曲线且 $38 < \text{Ct 值} < 40$ 时，可判定为非洲猪瘟病毒 CD2v 基因可疑，对可疑样品再进行 1 次复检，做 3 个重复反应，若 2 或 3 个重复反应的 Ct 值 < 40 ，且出现典型的扩增曲线，可判定为非洲猪瘟病毒 CD2v 基因阳性，其它结果判为非洲猪瘟病毒 CD2v 基因阴性。

2.2.3 非洲猪瘟病毒 MGF 基因 Cy5 信号通道下样品的扩增结果有典型的扩增曲线且 Ct 值 ≤ 38 时可判定为非洲猪瘟病毒 MGF 基因阳性；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 MGF 基因阴性；当样品的扩增结果有典型的扩增曲线且 $38 < \text{Ct 值} < 40$ 时，可判定为非洲猪瘟病毒 MGF 基因可疑，对可疑样品再进行 1 次复检，做 3 个重复反应，若 2 或 3 个重复反应的 Ct 值 < 40 ，且出现典型的扩增曲线，可判定为非洲猪瘟病毒 MGF 基因阳性，其它结果判为非洲猪瘟病毒 MGF 基因阴性。

3 注意

3.1 使用 ABI 系列荧光定量 PCR 仪时请将仪器参数“Passive Reference”设置为“None”。

3.2 阳性对照可直接使用，无需提取。