

## 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  $\mu\text{l}$  PCR 反应液；先取 5  $\mu\text{l}$  阴性对照、再取 5  $\mu\text{l}$  待检 DNA、最后取 5  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$ 。

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) 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，58 $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 秒，共 40 个循环；设置 58 $^{\circ}\text{C}$  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 被检样品 Ct 值 $\leq 38$  且出现特异性扩增曲线，判为阳性；当无 Ct 值或 Ct 值 $\geq 40$ ，判为阴性；当  $38 < \text{Ct 值} < 40$  且出现特异性扩增曲线，判为疑似。对疑似样品，进行复检 2 次，有 1 次出现 Ct 值 $< 40$  且出现特异性扩增曲线即判为阳性，否则判为阴性。

### 3 注意

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

3.2 阳性对照可直接使用，无需提取。