

非洲猪瘟病毒（VP72/I177L）核酸检测试剂盒（荧光定量 PCR 法）

YA-PCR-013

【名称】

非洲猪瘟病毒（VP72/I177L）核酸检测试剂盒（荧光定量 PCR 法）

【适用范围】

本产品用于全血、血清、血浆、口鼻咽拭子、组织样（脾、肺、淋巴结等）、环境样等样本中定性检测非洲猪瘟病毒核酸。

【检测原理】

本试剂盒以非洲猪瘟病毒基因组的 VP72 和 I177L 作为检测靶区域，设计特异性引物和特异 Taqman 探针进行检测。同时，本试剂盒通过加大检测样本量，保证试剂盒的检测灵敏度和精确度。在 PCR 反应体系中引入 UNG 酶+dUTP 措施，有效的降解扩增产物气溶胶污染，避免假阳性。

【产品组成】

组分	规格	数量
PCR 反应液	1450 μ L	1
酶混合液	50 μ L	1
阳性对照	500 μ L	1
阴性对照	500 μ L	1

【规格】50 检份/盒

【适用仪器】

西安天隆 Gentier 系列、杭州博日 FQD 系列、上海宏石 SLAN 系列、ABI 系列等支持 50 μ L 反应体系的荧光定量 PCR 仪。

【样本处理】

参照病毒核酸提取试剂盒说明书进行。

【操作步骤】

注：阳性对照和阴性对照不需要进行核酸提取！

1、试剂准备（试剂准备区）

取出试剂盒中的各组分，室温放置，待其温度平衡至室温后，充分融化混匀，并瞬时离心以去除管壁附着液体，取 N 个（N=待测样本数量+阴性对照+阳性对照+误差预留量）PCR 反应管，根据下表配制扩增体系：

组分	PCR 反应液	酶混合液
用量	29 μ L/份 \times N	1 μ L/份 \times N

在无菌离心管中加入上述试剂，充分混匀后瞬时离心，按照 30 μ L/管分装量将试剂分装至 PCR 反应管中，盖上盖子瞬时离心并转移至样本处理区备用。

注：亦可按照 50 检份直接将 PCR 反应液 1450 μ L、酶混合液 50 μ L 预混后分装使用。

2、样本提取（样本处理区）

将待测样本进行核酸提取，具体操作步骤按照核酸提取试剂盒说明书进行。

3、加样（样本处理区）

向含有 PCR 预混液的反应管中，分别加入提取的待测核酸、阴性对照、阳性对照各 20 μ L，盖紧管盖轻轻混合，瞬时离心后将 PCR 反应管转移至检测区。

4、PCR 扩增（检测区）

（1）取样本处理区准备好的 PCR 反应管，放置在实时荧光定量 PCR 仪样品槽相应位置，并记录放置顺序。

（2）按下表设置仪器核酸扩增相关参数进行 PCR 扩增，**FAM 和 VIC(HEX)**通道采集荧光信号，设置循环条件如下：

步骤	温度	时间	循环数
1 UNG 酶反应	50 $^{\circ}$ C	2min	1
2 Taq 酶活化	95 $^{\circ}$ C	6min	1
3 变性	94 $^{\circ}$ C	10s	45
退火，延伸，荧光采集	56 $^{\circ}$ C	30s	
4 仪器冷却	25 $^{\circ}$ C	10s	1

设置完成后，保存文件，运行程序。

注：（1）荧光信号采集设定第二阶段退火时：对于 ABI 荧光 PCR 仪，选择 FAM 通道读取检测结果，淬灭基团选择“None”；对于其它品牌的荧光 PCR 仪，不需要去设置。

（2）根据程序设定后，若 PCR 仪器不能运行程序，则将变性温度改为 95 $^{\circ}$ C；若程序还不能运行则省略第四步仪器冷却。

【质量控制】

试剂盒提供阳性对照和阴性对照，同一次实验必须同时满足下表要求，否则，实验无效，需重新进行。

对照	检测通道	正常结果 (Ct 值)
阴性对照	FAM	无典型 S 型曲线，无 Ct 值
	VIC(HEX)	无典型 S 型曲线，无 Ct 值
阳性对照	FAM	具有典型 S 型曲线，Ct 值<42
	VIC(HEX)	具有典型 S 型曲线，Ct 值<42

【检测结果说明】

通道	检测结果	检测结果	检测结果
FAM 通道	-	+	+
VIC (HEX) 通道	-	+	-
判定结果	阴性	阳性，I177L 无缺失	阳性，I177L 缺失

注：若 FAM 通道阴性，VIC (HEX) 通道出现阳性信号，则为异常结果，需重新提取核酸再进行复检。

【检测方法的局限性】

(1) 本试剂盒仅用于辅助诊断，不作为诊断检测的唯一依据，应结合病猪的发病症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑；

(2) 有关假阳/阴性结果的可能性分析

样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致结果不准确，可能出现假阴性结果；如果样本处理时有交叉污染，可能出现假阳性结果。

【注意事项】

(1) 本试剂盒仅用于科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。

(2) 试验前请熟悉和掌握需使用仪器的操作方法和注意事项，对每次试验进行质量控制。

(3) 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训；实验过程严格分区进行，所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用。

(4) 所有检测样品应视为具有传染性物质，实验过程中穿工作服，戴一次性手套并经常替换手套以及避免样品间的交叉污染；样本操作、废弃物处理均需符合相关法规要求。

(5) 所有的试剂在使用前，均需在室温下充分融化、混匀后使用。

(6) 实验中用过的吸头请直接打入盛有 10%次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物品一同丢弃。
工作台及各种实验用物品经常用 10%次氯酸钠、75%酒精和紫外灯进行消毒。

【贮藏与有效期】

-20℃避光保存，有效期 12 个月