

# 猪传染性胃肠炎病毒/猪流行性腹泻病毒/猪轮状病毒三重 核酸测试剂盒（荧光定量 PCR 法）

## YA-PCR-018

### 【名称】

猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）/猪流行性腹泻病毒（PEDV）/猪轮状病毒（PoRV）三重核酸检测试剂盒（荧光定量 PCR 法）

### 【适用范围】

本产品用于猪的粪便、肛门拭子样本、小肠等组织样本、母猪的乳汁样本、环境样等样本中定性检测猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）/猪流行性腹泻病毒（PEDV）/猪轮状病毒（PoRV）核酸。

### 【检测原理】

本试剂盒以猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）/猪流行性腹泻病毒（PEDV）/猪轮状病毒（PoRV）基因保守区作为检测靶区域，设计特异性引物和 Taqman 探针进行检测。同时，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	950 $\mu$ L	1
酶混合液	50 $\mu$ L	1
阳性对照	100 $\mu$ L	1
阴性对照	100 $\mu$ 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	19 $\mu$ L/份 $\times$ N	1 $\mu$ 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 20  $\mu$ 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。

## 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 5 $\mu$ 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**、**VIC** 和 **TexasRed** 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 逆转录	50°C	5 min	1
2 预变性	95°C	30s	1
3 变性	95°C	10s	45
退火，延伸，荧光采集	60°C	30s	
4 机器冷却	25°C	10s	1

设置完成后，保存文件，运行程序。

**注：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。**

### 【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	无典型 S 型曲线, 无 Ct 值
	TexasRed	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<40
	VIC	具有典型 S 型曲线, Ct 值<40
	TexasRed	具有典型 S 型曲线, Ct 值<40

### 【检测结果说明】

通道	检测结果	判定结果	检测结果	判定结果
FAM 通道	-	TGEV 阴性	+	TGEV 阳性
VIC 通道	-	PEDV 阴性	+	PEDV 阳性
TexasRed 通道	-	PoRV 阴性	+	PoRV 阳性

### 【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