

# 非洲猪瘟病毒 PCR MIX (荧光探针法冻干型)

## 说明书

### 【名称】

通用名 非洲猪瘟病毒 (ASFV) 荧光探针法 PCR 检测试剂

商品名无

英文名 African Swine Fever Virus Real - time PCR Test Kit

汉语拼音 Feizhouzhuwenbingdu Yingguang PCR Jiance Shijihe

### 【主要成分与含量】

组份名称	单位及数量	主要成分
8 管 PCR 条带 PCR 混合物 (冻干微球)	6 条	非洲猪瘟病毒 (ASFV) 基因特异性引物和探针、猪内标基因特异性引物和探针、外标引物探针, Taq DNA 聚合酶、dNTP、缓冲液、Mg <sup>2+</sup>
阳性质控品 (PC)	2 支	质粒, 携带非洲猪瘟病毒 (ASFV) 受体和猪内标基因的靶片段
外源性质控品	2 支	外源性质粒

**【作用与用途】** 用于全血、血清、血浆、淋巴结、脾脏、肾脏、扁桃体和肌肉、环境、饲料等样品中的非洲猪瘟病毒核酸的检测。

### 【需要自备的器材】

1. 试剂: 核酸提取试剂。
2. 仪器: 离心机、荧光 PCR 扩增仪、可调移液器 (20 $\mu$ L、200 $\mu$ L)。
3. 耗材: 吸头 (20 $\mu$ L、200 $\mu$ L)。

**【样品采集】** 病死或扑杀猪, 取脾脏、淋巴结、肾脏、扁桃体、肺、肌肉等; 待检活猪, 用注射器取血 5 mL; 或采集与病猪相关场所的粪便、饲料、污水等环境样品。2~8 °C 保存, 送实验室检测。(要求送检病料新鲜, 严禁反复冻融。)

### 【测试步骤】

首次使用试剂盒时, 将阳性对照微球溶解在 0.2 ml 无核酸酶水中, 作为阳性对照溶液, 等分并储存在 -25 °C ~ -15 °C 下。

#### 1. 检测准备

- 1) 样本处理: 按照相关标准对样本进行核酸提取。
- 2) 取待检测样本数量的微球反应管加 2 管 (阴、阳性对照), 并在各自的试管中添加以下内容:  
阳性对照 (1 管): 加入 20  $\mu$ l 阳性对照溶液  
NTC (1 管): 加入 20  $\mu$ l 无核酸酶的水  
待测样本: 加入 20  $\mu$ l 纯化的病毒核酸洗脱液, 不足 18 $\mu$ l 样本的需加入无核酸酶的水补足 18 $\mu$ l 体积;
- 3) 关闭试管盖, 充分混匀并离心。

#### 2. PCR 扩增

- 1) 将 PCR 反应管放入实时荧光 PCR 仪中进行 PCR 扩增反应。
- 2) PCR 扩增程序 (根据不同仪器可进行调整):

步骤	温度	时间	周期数
预变性	95 °C	3 分钟	1
变性	95 °C	10 秒	40-50
退火、延申、荧光检测	60 °C	30 秒	

荧光检测通道: FAM (靶标)、外标 (VIC)、CY5 (内标)。如使用 ABI 7500, 应将“被动参考染料”选项设置为“无”。

- 3) 记录每个荧光通道的 Ct 值。

#### 3. 测试结果的解释

1) 质量控制:

阳性和阴性对照的预期 Ct 值:

质控组	Fam 通道	VIC 通道	CY5 通道
阳性对照	≤ 25	≤28	≤30
NTC	-	>37	>37
“-” : 检测不到 Ct 值			

以上要求需要在同一实验中满足, 否则运行视为无效。

2) 结果判定

① 试验成立条件

阳性对照 Ct 值应≤25 且出现特异性扩增曲线, 阴性对照应无 Ct 值或 Ct 值≥40, 且无特异性扩增曲线, 试验结果有效; 否则应重新进行试验。

② 结果判定

样品 Ct 值≤37 且出现特异性扩增曲线, 判为阳性; 无 Ct 值且无特异性扩增曲线, 判为阴性; 当 37 < Ct 值 < 40 时判为可疑, 应重新提取样品核酸进行检测, 若 Ct 值仍 < 40, 则判为阳性, 若无 Ct 值且无特异性扩增曲线, 判为阴性。

4. 性能特性

1) 检测下限 (LLOD) : 200 个病毒基因组 DNA/ ml.

2) 精密度: 检测高、低浓度精密度的参比样品连续重复 10 次, 其 Ct 值的变异系数≤5%。

3) 敏感性和特异性

	PCR 试验阳性	PCR 试验阴性	小计
临床参考阳性	115	0	115
临床参考阴性	0	144	144
小计	115	144	
	灵敏性	特异性	
	100%	100%	

【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) PCR 冻干试剂对湿度敏感, 容易吸潮, 使用时应做好所有准备工作后, 再撕开包装铝箔袋, 若 pcr 管未全部用完, 需冷存, 再次使用时需在使用环境下回温再打开管盖加样。

(3) 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。

(4) 加样结束后应盖紧管盖, 以免液体蒸发。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 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。

(8) 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) 48 检份/盒 (2) 96 检份/盒

【贮藏与有效期】 30 度以下保存, 有效期 24 个月。

【生产厂家】