

非洲猪瘟病毒荧光PCR核酸检测试剂盒说明书确认稿



兽用

非洲猪瘟病毒荧光PCR核酸检测试剂盒说明书

【兽药名称】

通用名称：非洲猪瘟病毒荧光PCR核酸检测试剂盒
汉语拼音：Feizhouzhuwen Bingdu Yingguang PCR Hesuan Jianceshijihe
英文名称：African swine Fever Virus (ASFV) PCR Nucleic Acid Diagnostic Kit
商品名称：无

【主要成分与含量】 试剂盒中含有如下组分：

试剂盒组分	含量
阳性对照	250μl/管×1管
阴性对照	250μl/管×1管
PCR反应液	850μl/管×1管
酶混合液	150μl/管×1管
说明书	1份/盒

【作用与用途】 本试剂盒可用于血液、脾脏、肝脏、淋巴结、扁桃体、肾脏、肌肉、环境样品等样品中非洲猪瘟病毒核酸的检测。

【用法与判定】

1 用法

1.1 待检样品采集、保存及运输

1.1.1 样品采集

- (1) 活猪样品 无菌采集抗凝血或血清 5 ml。
- (2) 病死猪剖检样品或屠宰场剖检样品 无菌采集死猪的脾、肺、肾、扁桃体、淋巴结、肌肉等组织样品。2~8℃低温运至实验室用于检测。
- (3) 病猪污染的周边环境 采集与病猪相关场所的粪便、饲料、污水样品。2~8℃低温运至实验室用于检测。

1.1.2 样品保存 采集的样品在2~8℃保存应不超过24小时，-70℃条件下保存，避免反复冻融。

1.1.3 样品运输 泡沫箱加冰袋后密封进行运输。包装和运输应符合农业农村部《高致病性动物病原微生物(毒)种或者样品运输包装规范》和交通运输部门关于危险品运输管理的有关规定。

1.2 样品处理

1.2.1 血液样品处理 抗凝血样品置于离心管中，8000r/min离心2分钟取上层血浆，编号待检。非抗凝血样品置于离心管中，待凝固后，8000r/min离心2分钟取200μl上层血清，编号待检。

1.2.2 组织样品处理 取适量脾脏、肝脏、淋巴结、扁桃体、肌肉等组织，置于研磨器或研磨管中研磨，再加适量生理盐水混匀，制成约10%的组织匀浆，8000r/min离心2分钟，取200μl上清于RNase/DNase-free无菌离心管中，编号备用。

1.2.3 环境样品处理

1.2.3.1 粪便、饲料样品处理方法 取适量的粪便、饲料放入盛有PBS缓冲液的研磨管中研磨混匀，制成约10%的匀浆液，8000r/min离心2分钟，取200μl上清于RNase/DNase-free无菌离心管中，编号备用。

1.2.3.2 污水样品处理方法 直接取200μl污水进行核酸提取。

1.3 病毒核酸的提取 用磁珠法或柱式法进行DNA核酸提取。

1.4 荧光PCR反应：

1.4.1 从试剂盒中取出荧光PCR反应液、酶混合液，室温融化后，2000r/min离心5秒。设被检样品、阳性对照和阴性对照总和为n，则反应体系配制如下：

仅供兽医诊断使用

试剂	体系
PCR反应液	17× (n+1) μl
酶混合液	3× (n+1) μl

1.4.2 在新的RNase/DNase-free 1.5ml离心管中加入上述试剂，充分混匀后瞬时离心。按照20μl/管分装量将试剂分装至荧光PCR反应管。

1.4.3 在上述制备好的荧光PCR反应管中分别加入阴性对照、阳性对照各5μl、处理好的待测核酸各5μl，终体积25μl/管，盖好荧光PCR反应管盖，混匀后瞬时离心，转移到荧光PCR仪器上。

1.4.4 将PCR反应管放置在荧光PCR仪样品槽中，在荧光PCR仪上运行以下程序：

步骤	条件	循环数
UNG处理	50℃，2分钟	1
预变性	95℃，3分钟	1
预扩增	95℃:8秒 55℃:8秒	5
PCR扩增	95℃:8秒 55℃:8秒	40

荧光通道选择FAM，在PCR扩增阶段每个循环的55℃时采集荧光信号。设置扩增体系为25μl，同时要选passive reference和quencher为none的模式。(注：若荧光PCR仪(如ABI7500)按说明书中的反应程序设置后因持温时间短无法运行，可将预扩增和PCR扩增条件变更为95℃：5秒 55℃:30 秒)

2 结果判定

2.1 试验有效性判定

阳性对照有典型扩增曲线且Ct值≤30，且阴性对照无Ct值或无扩增曲线，线形为直线或轻微斜线，无指数增长期。则判试验结果有效。否则，此次试验视为无效。

2.2 样品判定

2.2.1 阳性：样本检测结果Ct值≤35且有明显指数增长期，判定检出非洲猪瘟病毒核酸。

2.2.2 可疑：样本检测结果Ct值在35~38范围内。此时应对样本进行重复检测，如果重复实验结果Ct值仍在35~38范围内，有明显指数增长期，则判定为阳性，否则为阴性。

2.2.3 阴性：样本检测结果Ct值>38或无Ct值，判定未检出非洲猪瘟病毒核酸。

【注意事项】(1) 实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按照操作步骤执行，在操作过程中对时间、试剂体积等精确控制可以获得最好的结果。

(2) 实验室应严格按照有关规定分区管理，依照配液区→模板提取区→扩增区→分析区顺序进行基因检测。各区间人员、器材、试剂及空气流向应有严格要求。

(3) 核酸提取有关耗材确保洁净、无DNase/RNase，提取过程尽量低温、快速，完成后进入下一步实验或冻保。

(4) 对于顶部采光仪器要带新的一次性PE手套对荧光PCR管封盖，对于底部采光仪器要避免徒手或使用过的手套接触荧光PCR管底，检测过程中使用不带荧光物质一次性乳胶手套。

(5) 冻存试剂使用前应于室温下完全融化，瞬时离心使液体完全沉于管底。避免反复冻融，以免影响试剂性能。

(6) 样品、阳性对照等在使用后及时封盖，避免组分间及气溶胶等的污染造成假阳性。

(7) 扩增产物禁止开盖，实验产生的废弃物及时收集，远离PCR实验室进行无害化处理。

【规格】 50 份/盒

【贮藏与有效期】 置-20℃以下避光保存，有效期12个月。

【批准文号】兽药生字 090298871

【生产企业】申联生物医药（上海）股份有限公司

地址：上海市闵行区江川东路48号

邮编：200241

电话：400-620-6808

http://www.slbio.com.cn/

仅供兽医诊断使用