

非洲猪瘟病毒荧光定量 PCR 检测试剂盒

（免提法）

Version2.1

试剂盒应用

本试剂盒主要用于动物组织及血液中非洲猪瘟病毒 DNA 的检测。将组织液（包括组织研磨液、细胞悬液、血液、血清、精液、唾液、尿液等）、组织块、拭子以及环境等样本进行处理后，可直接用于扩增。

Rapid DNA-Lysis 采用专利配方，5 分钟内裂解各种常见样本，1 小时内获得检测结果。使用 Rapid DNA-Lysis 无需大体积样本、无需反复离心，从而获得高质量的 DNA 模板。

改良的荧光 PCR 反应液对 PCR 抑制剂具有良好抵抗能力，从容应对临床中出现的各种常见样本。

本试剂盒仅供研究使用，不可用于临床、食品、化妆品等领域。

试剂盒组成

组分	DIAG001（50 次）
Rapid DNA-Lysis	1 mL
荧光 PCR 反应液	1 mL
阳性对照	100 μL
阴性对照	100 μL
说明书	1 份

保存条件

-20° C 保存。

使用前将 Rapid DNA-Lysis 室温充分混匀。

荧光 PCR 反应液、阳性对照、阴性对照溶解后需置于冰上，避免反复冻融。

需要准备

荧光定量 PCR 仪、金属恒温浴、离心机、移液器

使用方法

一、不同样品的处理方法

1. 组织液的处理

（1）组织液包括组织研磨液、细胞悬液、血清、血液*、唾液、尿液、精液等。取 10 μL 组织液置于离心管中。

※：组织液为血液样品时，先将样品按照 1:40 稀释（例如 5 μL 样品加入 195 μL 生理盐水或无菌水中）。取 10 μL 置于离心管中。

（2）加入 20 μL Rapid DNA-Lysis。

（3）充分混匀。

- (4) 置于 55℃作用 5 分钟。溶液即为 DNA 模板。
2. 组织块的处理
- (1) 用眼科剪取半颗米粒大小的组织块（约 1mm³），并将组织块剪成肉泥状。
 - (2) 加入 20 μL Rapid DNA-Lysis。
 - (3) 充分混匀。
 - (4) 置于 55℃作用 5 分钟。
 - (5) 8000 转离心 30 秒取上清。上清即为 DNA 模板。
3. 环境样本和拭子的处理
- (1) 用医用棉签反复涂抹桌面、鞋底、头发、车轮等表面，并将棉签浸泡在 500μL 生理盐水或无菌水的 1.5mL 离心管中，反复挤压，并作用 5 分钟。
 - (2) 吸取 10 μL (1) 中液体，加入 20 μL Rapid DNA-Lysis。
 - (3) 充分混匀。
 - (4) 置于 55℃作用 5 分钟。溶液即为 DNA 模板。
4. 提取对照的处理
- (1) 在上述 1, 2, 3 样品处理的同时，取 10 μL 生理盐水或无菌水加入 20 μL Rapid DNA-Lysis。
 - (2) 充分混匀。
 - (3) 置于 55℃作用 5 分钟。溶液即为 DNA 模板。

二、在 DNase free 的离心管中配制荧光定量 PCR 反应体系

	阴性对照 (20 μL)	待检样品 (20 μL)	阳性对照 (20 μL)	提取对照 (20μL)
荧光 PCR 反应液	18 μL	18 μL	18 μL	18 μL
待检样品	-	2 μL	-	-
阳性对照	-	-	2 μL	-
阴性对照	2 μL	-	-	-
提取对照	-	-	-	2 μL

三、按照以下方法设定荧光定量 PCR 反应

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 °C	3 min	1
变性	95 °C	10 s	40
退火延伸	60 °C	35 s	

设置荧光基团为 Fam，淬灭基团为 BHQ，参比基团为 None。退火延伸步骤中采集荧光数据。

四、结果判定

阳性对照：Ct 值<35 且有明显扩增曲线，呈典型的 S 型曲线。

阴性对照：无 Ct 值，无明显扩增曲线。

提取对照：无 Ct 值，无明显扩增曲线。

待检样品：Ct 值>40 或无，则为阴性。

35<Ct<40，且有 S 形扩增曲线，则为可疑。可疑样品需重新处理样品后再次检测，若 Ct<40 且出现 S 形曲线，则为阳性，否则为阴性。

Ct≤35，且有明显的 S 形扩增曲线则为阳性。若扩增曲线呈不规则形状需重新检测。

注意事项

- (1) 所有试剂应按照指定温度储存。请勿反复冻融。
- (2) 检测过程应按照分区（试剂准备区、样本制备区、核酸扩增区）进行。各区物品（包括耗材、移液器等）专用，不得交叉使用，避免污染。
- (3) 检测前后均需要对操作区进行消毒，消毒方式可以采用 75%乙醇或核酸消除剂等。耗材均需使用商品化的无酶耗材。
- (4) 为了避免对检测结果的影响，应避免使用含有荧光物质的手套，避免用手直接接触各项试剂，预防交叉污染。
- (5) **Rapid DNA-Lysis** 采用专利配方，若出现肉眼可见小球状物质属于正常现象。
- (6) 采集全血时应当使用 EDTA 抗凝，而勿使用肝素。
- (7) 样品处理过程中应当防止交叉污染，推荐按照以下加样顺序加样，依次为阴性对照、待检测样本、提取样本、阳性对照。
- (8) 使用阳性对照时应特别注意防止污染。
- (9) 整个过程中使用的吸头、离心管等耗材应丢弃在含有 75%乙醇或核酸消除剂的容器中，防止形成环境污染。
- (10) **PCR** 反应完成后，用完的 **PCR** 管直接丢弃，严禁在实验区开盖，以防止气溶胶污染。
- (11) 为防止试剂盒污染，请勿将不同批号试剂盒混用。