

非洲猪瘟病毒荧光定量 PCR 检测试剂盒说明书（探针法）

50 头份/盒

作用与用途：

用于猪脾脏、淋巴结、肉品、血液及血液制品中病毒核酸的检测。

用法与判定：

1.用法

1.1 样品处理:以下样品处理后置 60°C 灭活 30 分钟。

1.1.1 组织样品:取 100mg-200mg 待检组织样品（脾脏、淋巴结、肉品），用研钵或者组织匀浆仪充分研磨匀浆后，加入 1ml PBS（pH7.2）混匀；然后以 1000r/min 离心 3 分钟，吸取 200ul 上清，置于 1.5ml 离心管中，编号备用。

1.1.2 血液:采集抗凝血，吸取 200ul，置 1.5ml 离心管中，编号备用。

1.1.3 血液制品:取 100mg-200mg 待检血液制品（如血浆蛋白粉），置于 1.5ml 离心管中，加入 1ml PBS（pH7.2），充分混匀震荡后，以 10000r/min 离心 3 分钟，吸取 200ul 上清，置于 1.5ml 离心管中，编号备用。

1.2 样品存放:采集或处理好的样品在 2-8°C 保存应不超过 24 小时；若需长期保存，须放置 -70°C 以下冰箱，并应避免反复冻融。

1.3 DNA 提取:用商品化试剂盒按其说明书，对处理好的样品提取 DNA。

1.4 荧光 PCR 反应体系的配置:取出试剂盒中的各组分，置室温（15-25°C）融化后瞬时离心，备用。每次检验设阴、阳性对照。设待检样品、阳性对照和阴性对照的样品总份数为 n，按如下反应体系配置：

2 X qPCR Mix	12.5ul x (n+1)
引物探针预混液	7.5ul x (n+1)
总量	20ul x (n+1)

将以上配置的反应体系充分混匀后，按 20ul/管分装至反应管中。分别取 DNA 样品 5ul 加入相应反应管中，盖紧管盖后瞬时离心。

1.5 荧光 PCR 反应条件：

温度	时间	循环数	说明	是否收集信号
95°C	3min	1cycle	预变性	否
95°C	15sec	40-45cycle	变性	否
60°C	30sec		退火，延伸	是 (FAM)

对于 ABI 荧光 PCR 仪，选择 FAM 通道读取检测结果，淬灭基团选择“MGB”；

对于其它品牌的荧光 PCR 仪，选择 FAM 通道读取检测结果，淬灭基团选择“None”

本产品使用特殊的 ROX Reference Dye，适用于所用 qPCR 仪器，无需在不同的仪器上调整 ROX 的浓度。



2. 试验成立条件:

阳性对照 Ct 值 ≤ 35 并出现典型的扩增曲线, 阴性对照无 Ct 值或无典型的扩增曲线, 则判为试验成立。

3. 判定:

待检测样品 Ct 值 ≤ 35 并出现典型的扩增曲线, 判为阳性; 待检样品无 Ct 值或 $35 < \text{Ct 值} \leq 40$ 并且无典型的扩增曲线, 判为阴性。

注意事项

1. 试剂盒应在 -20°C 以下保存和运输。
2. 本试剂盒仅用于科研检测使用, 操作人员必须经过培训, 试剂盒使用前请仔细阅读说明书全文。
3. 不要使用过期组分或者不同批次组分混合使用。
4. 使用时尽量避免反复冻融, 如冻融, 应不超过 3 次。
5. 样品采集和处理过程应戴一次性手套, 并及时更换, 样品间严禁交叉污染。
6. 荧光 PCR 实验严格分区操作, 各区应有专用的手套、移液器等, 不得交叉使用, 避免污染; 工作人员应遵循单方向工作原则, 各工作区相对隔离。
7. 进行荧光 PCR 实验的工作桌面及相关物品应定期用 1% 次氯酸钠、75% 酒精、1mol/L 盐酸依次灭菌和消毒, 或定期用紫外灯灭菌和消毒。
8. 测试样品时, 应做好生物安全防护。
9. 试验完毕后, 使用过的试剂盒、样品和试剂应进行无害化处理。

