

## 猪繁殖与呼吸综合征病毒欧洲型和美洲型 双重实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒使用说明书

**用途** 本试剂盒采用实时荧光 RT-PCR 方法检测细胞培养物、猪血清和猪肺脏中的猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）欧洲型和美洲型的 RNA。适用于 PRRSV 欧洲型和美洲型的鉴别诊断、检测和流行病学调查。

**原理** 利用离心柱内硅基质膜提取样品总 RNA，在高效反转录酶的作用下，以 RNA 为模板，以引物为起点合成与 RNA 模板互补的 cDNA 链。在热启动 Taq 酶的作用下，经高温变性、中温退火及延伸的循环，使特异 DNA 片段的拷贝数放大一倍，经荧光素标记的探针与扩增的 DNA 杂交，利用 Taq 聚合酶的 5'→3'外切活性，使荧光探针的报告基团与淬灭基团分离，发出特异性荧光信号，利用荧光 PCR 仪检测特异性荧光信号，根据样品 Ct 值的大小及扩增曲线的形成情况判定结果。

### 试剂盒组成

| 名称         | 50 头份  | 贮藏条件       |
|------------|--------|------------|
| 裂解液        | 30 mL  | 室温（A 盒）    |
| 洗液         | 60 mL  |            |
| 洗脱液        | 10 mL  |            |
| 吸附柱和收集管    | 50 套   |            |
| 阴性对照       | 1 mL   | -20 ℃（B 盒） |
| 阳性对照       | 600 μL |            |
| 无菌无核酸酶水    | 600 μL |            |
| RT-PCR 反应液 | 750 μL |            |
| 酶混合液       | 60 μL  |            |
| 荧光探针       | 200 μL |            |

**保存期** 本产品有效期为 12 个月。

### 需要自备的物品

1. 仪器：分析天平、离心机、荧光 PCR 扩增仪、组织研磨器、-20 ℃冰箱、可调移液器（2 μL、20 μL、200 μL、1000 μL）。
2. 耗材：荧光 PCR 专用反应管、眼科剪、眼科镊、生理盐水、1.5 mL 经焦碳酸二乙酯（DEPC）水处理的灭菌离心管、吸头（10 μL、200 μL、1000 μL）、灭菌双蒸水。

### 注意事项

1. 所有接触病料的物品均应合理处置，以免污染实验室。
2. PCR 整个试验分配液区、模板提取区、扩增区。流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区。严禁器材和试剂倒流。
3. 所有试剂应在规定的温度储存。-20℃保存的各试剂管使用前应完全融化，8000 rpm 离心 15 s，使液体全部沉于管底，放于冰盒中，吸取液体时移液器吸头尽量在液体表面层吸取，使用后应立即放回-20 ℃。
4. 在 RNA 提取过程中，避免 RNA 酶污染，尽量缩短操作时间。
5. 注意防止试剂盒组分受污染。不要使用超过有效期限的试剂，试剂盒之间的成分不要混用。
6. 严格遵守操作说明可以获得最好的结果。操作过程中移液、定时等全部过程必须精确。
7. 反应体系应在特定配液区或者超净工作台配制，整个实验过程严格控制污染。
8. 反复冻融试剂将减低检测灵敏度，本试剂盒应在 3 次内用完，请严格按试剂盒说明书操作。

## 样品制备

**1 样品采集：**剖检猪取肺脏组织；待检活猪，用注射器取血 5mL 或分离血清。2~8 °C 保存，加冰密封运输，送实验室检测（要求送检病料新鲜，严禁反复冻融）。

**2 样品处理：**每份样品分别处理。

**2.1 组织样品处理：**每份组织分别从三个不同的位置称取样品约 1g，用手术剪剪碎混匀后取 0.05 g 于研磨器中研磨，加入 1.5 mL 生理盐水继续研磨，待匀浆后转至 1.5 mL 灭菌离心管中，8000 rpm 离心 2 min，取上清液 100 μL 于 1.5 mL 灭菌离心管中。

**2.2 全血样品处理：**待血凝后取血清 100 μL，置 1.5 mL 灭菌离心管中。

**2.3 阳性对照处理：**取阳性对照 100 μL，置 1.5 mL 灭菌离心管中。

**2.4 阴性对照处理：**取阴性对照 100 μL，置 1.5 mL 灭菌离心管中。

## 操作步骤

### 1 病毒 RNA 的提取

**1.1** 取已处理的样品、阴性对照和阳性对照，分别加入裂解液 600 μL，充分颠倒混匀，室温静置 3~5 min。

**1.2** 将液体吸入吸附柱中（吸附柱要套上收集管，吸取液体时尽量不要吸到悬浮杂质，以免离心时堵塞吸附柱），13000 rpm 离心 30 s。

**1.3** 弃去收集管中液体，加入 600 μL 洗液，13000 rpm 离心 30 s。

**1.4** 重复步骤 1.3。

**1.5** 弃去收集管中液体，13000 rpm 空柱离心 2 min，以除去残留的洗涤液。

**1.6** 将吸附柱移入新的 1.5 mL 离心管中，向柱中央加入洗脱液 50 μL，室温静置 1 min，13000 rpm 离心 30 s，离心管中液体即为模板 RNA。

### 2 实时荧光 RT-PCR 操作

设被检样品、阴性对照和阳性对照总和为 N，则反应体系配制如下：

| 试剂         | 体系                              |
|------------|---------------------------------|
| 无菌无核酸酶水    | $5.6 \times (N+1) \mu\text{L}$  |
| RT-PCR 反应液 | $12.5 \times (N+1) \mu\text{L}$ |
| 酶混合液       | $1.0 \times (N+1) \mu\text{L}$  |
| 荧光探针       | $3.4 \times (N+1) \mu\text{L}$  |

将以上配制的反应体系充分混匀后，分装每个反应管中各 22.5 μL。

分别取 2.5 μL 模板 RNA，加入相应反应管中，混匀并作好标记，设置待检探针，其中欧洲型荧光报告基团为 FAM，美洲型荧光报告基团为 HEX（如果仪器没有 HEX 校正过，可暂时用 VIC 代替），淬灭基团均为 None。在荧光 PCR 仪上进行以下反应：42 °C 5 min，95 °C 10s；循环 95 °C 5 s，60 °C 35 s，共 40 次，在每次循环第二步（60 °C 35s）收集荧光信号。

## 结果判定

### 1 结果分析条件设定

阈值设定原则：阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

### 2 结果描述及判定

阳性对照 Ct 值 ≤ 30 并出现特定的扩增曲线，阴性对照无 Ct 值并且无特定扩增曲线，实验结果成立；被检样品若 FAM 荧光信号 Ct 值 ≤ 30 并出现特定的扩增曲线为欧洲型阳性；被检样品若 HEX 荧光信号 Ct 值 ≤ 30 并出现特定的扩增曲线为美洲型阳性；被检样品 30 < Ct < 37 并出现特定的扩增曲线，需重新取样提取 RNA，扩增后进行结果判定，如仍是可疑，可判定为阳性；被检样品 Ct 值 ≥ 37 时，超过本方法检测灵敏度范围，判定为阴性；对于某些未呈现 S 型曲线，但本底较高的样品，应为阴性。