

## 猪伪狂犬病毒 PCR 检测试剂盒使用说明书

**用途** 猪伪狂犬病毒（PRV）聚合酶链反应（PCR）试验用于检测猪血清和组织中的 PRV，适用于 PRV 的检测、诊断和流行病学调查。

**原理** 利用离心柱内惰性大分子膜提取病料 DNA 作为模板，高温使模板的一条双链 DNA 变性后形成两条单链，低温使引物与互补的模板形成双链，中温时，在 TaqDNA 聚合酶作用下，以 dNTP 为原料，以引物为复制的起点，沿模板合成一条新链。每个循环包括：高温变性、低温退火、适温延伸三个过程。每一次循环使扩增的 DNA 片段拷贝数放大一倍。经过 35 次循环，使扩增的 DNA 片段放大了数百万倍。将扩增产物进行电泳，经染色后，在紫外灯照射下，肉眼可见到 DNA 片段的扩增带。

### 试剂盒组成

名称	10 头份	50 头份	贮藏条件
0.2 mL 薄壁 PCR 管	15 个	60 个	室温 (A 盒)
DNA 吸附柱和收集管	10 套	50 套	
消化液	2.4 mL	11mL	
DNA 结合液	3.6 mL	16mL	
DNA 洗涤液	12 mL	52mL	
DNA 洗脱液	1 mL	4 mL	
矿物油	300 $\mu$ L	1.2 mL	
50 倍 TAE 电泳缓冲液 (50 倍稀释后使用)	20 mL	100 mL	
上样缓冲液	50 $\mu$ L	250 $\mu$ L	
染色液	20 $\mu$ L	50 $\mu$ L	
蛋白酶 K	240 $\mu$ L	1.1mL	-20 $^{\circ}$ C (B 盒)
阴性对照	350 $\mu$ L	1 mL	
阳性对照	350 $\mu$ L	1 mL	
PCR 反应液	200 $\mu$ L	1 mL	
Taq DNA 聚合酶	25 $\mu$ L	120 $\mu$ L	

**保存期** 本产品有效期为 6 个月。

### 需要自备的物品

1. 仪器：分析天平、水浴锅、离心机、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪（或紫外分析仪）、微波炉、组织研磨器、-20  $^{\circ}$ C 冰箱、可调移液器（2  $\mu$ L、20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L）。
2. 耗材：眼科剪、眼科镊、称量纸、20 mL 一次性注射器、1.5 mL 灭菌离心管、琼脂糖、500 mL 量筒、500 mL 锥形瓶、吸头（10  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L）、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、电泳区。流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区→电泳区。严禁器材和试剂倒流。
3. 所有试剂应在规定的温度储存。-20 $^{\circ}$ C 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，使用后立即放回-20  $^{\circ}$ C。

4. 消化液低温时可能出现结晶，请于 37 °C 温育，溶解至澄清透明后使用。
5. 染色液低毒，操作时应戴上手套，避光保存，较长时间不使用请存放于 4 °C，以免挥发变干。染色液和上样缓冲液使用前也请离心使液体沉于管底。
6. 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。
7. 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。
8. 反复冻融试剂将减低检测灵敏度，建议在 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：**病死或扑杀猪，取大脑海马背侧皮层、中脑、脑桥、扁桃体、淋巴结等组织；待检活猪，用棉拭子取鼻腔分泌物，置于 50% 甘油生理盐水中，或用注射器取血 5 mL。2~8 °C 保存，送实验室检测。

**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，再加入 200 μL 消化液和 20 μL 蛋白酶 K，振荡混匀后，置 56 °C 水浴中消化 1 小时。

2.2 全血样品处理：待血凝后取血清 100 μL，加入 200 μL 消化液和 20 μL 蛋白酶 K，振荡混匀后，置 56 °C 水浴中消化 1 小时。

2.3 阳性对照处理：取阳性对照 100 μL，加入 200 μL 消化液和 20 μL 蛋白酶 K，振荡混匀后，置 56 °C 水浴中消化 1 小时。

2.4 阴性对照处理：取阴性对照 100 μL，加入 200 μL 消化液和 20 μL 蛋白酶 K，振荡混匀后，置 56 °C 水浴中消化 1 小时。

## 操作步骤

### 1 病毒 DNA 的提取

1.1 从水浴锅中取出样品管，降至室温后，加入 300 μL DNA 结合液，颠倒混匀，将全部液体移入吸附柱中（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），室温静置 3 min，10000 rpm 离心 30 s。

1.2 弃去收集管中液体，加入 500 μL DNA 洗涤液，10000 rpm 离心 30 s。

1.3 重复步骤 1.2。

1.4 弃去收集管中液体，10000 rpm 空柱离心 1 min，以除去残留的 DNA 洗涤液。

1.5 将吸附柱放入新的 1.5 mL 离心管中，向柱中央加入 DNA 洗脱液（最好 56 °C 预热）50 μL，室温放置 2 min，10000 rpm 离心 30 s，离心管中液体即为模板 DNA。

### 2 PCR 扩增

每份总体积 20 μL，含 16 μL PCR 反应液（用前混匀），2 μL Taq DNA 聚合酶，2 μL 模板 DNA。

例如：n 份样品，配制 n+1 份，16 × (n+1) PCR 反应液，再加入 2 × (n+1) Taq DNA 聚合酶，混匀后取 18 μL 分装成 n 份，分别加入 2 μL 模板 DNA，加入 20 μL 矿物油覆盖（有热盖的 PCR 扩增仪不用加），作好标记。

在 PCR 扩增仪上进行以下程序：94 °C 3 min；循环 94 °C 30 s，65 °C 30 s，72 °C 30 s，共 35 次；再 72 °C 延伸 7 min。

### 3 电泳

称 4 g 琼脂糖放于 500 mL 锥形瓶中，加入 50 倍稀释的 TAE 电泳缓冲液 200 mL（取 4 mL 50 倍 TAE 电泳缓冲液，用双蒸水稀释至 200 mL），于微波炉中熔解，再加入 10 μL 染色液混匀。在电泳槽内放好梳子，倒入琼脂糖凝胶，待凝固后将 PCR 扩增产物 10 μL 混合 2 μL 上样缓冲液，点样于琼脂糖凝胶孔中，以 110~120 V 电压于 50 倍稀释的 TAE 电泳缓冲液中电泳，紫外灯下观察结果。

**结果判定** 阳性对照出现 217 bp 扩增带、阴性对照无带出现（引物带除外）时，实验结果成立。

被检样品出现 217 bp 扩增带为 PRV 阳性，否则为阴性。