

猪细小病毒 PCR 检测试剂盒使用说明书

用途 猪细小病毒（PPV）聚合酶链反应（PCR）试验用于检测猪血清和组织中的 PPV，适用于 PPV 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 μ 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 μ L	250 μ L	
染色液	20 μ L	50 μ L	
蛋白酶 K	240 μ L	1.1mL	-20 $^{\circ}$ C（B 盒）
阴性对照	350 μ L	1 mL	
阳性对照	350 μ L	1 mL	
PCR 反应液	200 μ L	1 mL	
Taq DNA 聚合酶	25 μ L	120 μ 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 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ 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 μ L、200 μ L、1000 μ 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: 疑似感染仔猪取肠系膜淋巴结或肝脏; 流产或死产胎儿的肾、肺、肝、脑、睾丸和胎盘肺、淋巴结等组织; 待检活猪, 用注射器取血 5 mL。2~8 °C 保存, 送实验室检测。(要求送检病料新鲜, 严禁反复冻融病料。)

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, 55 °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 313 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 313 bp 扩增带为 PPV 阳性, 否则为阴性。