非典型性猪瘟病毒实时荧光 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 方法检测猪组织中的非典型性猪瘟病毒（ APPV） 的 RNA，适用于 APPV 的检测、诊断和流行病学调查。

【原理】提取样品 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】

组成	50 头份	贮藏条件
阴性对照	1mL	-20℃
阳性对照	600μL	
无菌无核酸酶水	600μL	
RT-PCR 反应液	600μL	
酶混合液	24μL	
荧光探针	115μL	
说明书	1 份	

【需要自备的器材】

1．试剂：核酸提取试剂。
2．仪器：离心机、荧光 PCR 扩增仪、-20℃冰箱、可调移液器（2μL、20μL、200μL、1000μL）。
3．耗材：荧光 PCR 专用反应管、吸头（10μL、200μL、1000μL）。

【使用注意事项】

1．建议与世纪元亨提供的柱式 RNA 核酸提取试剂盒配套使用。
2．实验过程中进行阴性对照和阳性对照样品的质量控制。
3．所有接触病料的物品均应合理处置，以免污染实验室。
4．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。
5．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，8000rpm 离心 15s，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℃。
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．反应体系应在特定配液区或者超净工作台中配制，整个实验过程严格控制污染。
9．反复冻融试剂将降低检测灵敏度，本试剂盒应在 3 次内用完。

【样品采集】

病死或扑杀猪，取胃、小脑、小肠、颌下淋巴结等组织。2～8 ℃保存，送实验室检测。要求送检病料新鲜，严禁反复冻融。

【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	2.7（N+1）μL
RT-PCR 反应液	10（N+1）μL
酶混合液	0.4（N+1）μL
荧光探针	1.9（N+1）μL

将以上配制的反应体系充分混匀后，分装每个反应管中各 15 μL。分别取 5 μL 模板 RNA，加入相应反应管中，混匀并作好标记，在荧光 PCR 仪上进行以下反应：45 ℃ 15 min，95 ℃ 1min；95 ℃ 5 s，56 ℃ 35 s，在每个循环第二步（56℃ 35s）收集荧光信号，共 40 个循环。（报告基团“FAM”，淬灭基团“None”）。

【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 并出现特异性扩增曲线，阴性对照无 Ct 值并且无特异性扩增曲线，实验结果成立；被检样品若 FAM 荧光信号 Ct 值≤30 并出现特异性扩增曲线为 APPV 阳性；被检样品 30＜Ct＜36 并出现特异性扩增曲线，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≥36 时，超过本方法检测灵敏度范围，判定为阴性；**对于某些未呈现特异性扩增曲线，但本底较高的样品，判为阴性。**

【规格】50 头份/盒

【保存及有效期】于-20℃以下保存，有效期为 12 个月。