猪伪狂犬病毒（gE 基因）实时荧光 PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 方法检测猪血清、组织和精液中的猪伪狂犬病毒 gE 基因，适用于 PRV 野毒感染或感染过含有 gE 抗原的疫苗检测和流行病学调查，也可用于含有 gE 抗原的疫苗和 gE 基因缺失疫苗的鉴别诊断。

【原理】

提取样品 DNA 作为模板，以引物为起点合成与 DNA 模板互补的新链，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	1 mL	-20℃
阳性对照	600 μL	
无菌无核酸酶水	600 μL	
PCR 反应液	600 μL	
荧光探针	125 μL	
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 DNA 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，需进行提取，建议提取用量分别为 100μL。
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，或取精液置于 1.5 mL 离心管中。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 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	5.9×（N+1）μL
PCR 反应液	10×（N+1）μL
荧光探针	2.1×（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 18 μL。

分别取 2 μL 模板 DNA，加入相应反应管中，混匀并作好标记。在荧光 PCR 扩增仪上进行以下反应：95 ℃ 2 min；循环 95 ℃ 5 s，60 ℃ 35 s，共 40 次，每次循环的第二步（60 ℃ 35 s）收集荧光信号（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 Ct 值≤30 并出现特定的扩增曲线为 PRVgE 阳性；被检样品 30＜Ct＜35 并出现特定的扩增曲线，需重新取样提取 DNA，扩增后进行结果判定，如仍是可疑，则判定为阳性；被检样品 Ct 值≥35 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，应判定为阴性。**

【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。

【生产企业】哈尔滨元亨生物药业有限公司

【地址】哈尔滨利民开发区珠海路 1 号