

非洲猪瘟病毒快速 PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

用于检测猪血液、脾脏、淋巴结或肾脏等组织中非洲猪瘟病毒（ASFV）的 DNA，适用于 ASFV 的检测、诊断和流行病学调查。

【原理】

直扩反应体系管中含有抗 PCR 反应抑制物的试剂，样品可直接进行 PCR，不需要进行 DNA 纯化。在热启动 TaqDNA 聚合酶作用下，经退火-延伸，每一次循环使扩增的 DNA 片段拷贝数放大一倍。经过多次循环，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	数量	贮藏条件
50 倍 TAE 电泳缓冲液（50 倍稀释后使用）	20mL*2	室温 (A 盒)
染色液	20μL*2	
阴性对照	50μL	-20℃ (B 盒)
阳性对照	50μL	
直扩反应体系管	24 支	
DNA Marker (DL5000)	3 支	

【需要自备的物品】

- 仪器：**分析天平、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℃ 冰箱、可调移液器（10 μL、1000 μL）。
- 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 μL、1000 μL）、灭菌双蒸水。

【操作步骤】

1、样品采集：病死或扑杀猪的脾脏、淋巴结或肾脏等病变部与健康部交界处组织；待检活猪，用注射器抽取血液至少 2mL。2~8℃ 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、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。

3、PCR 扩增：

待反应液融化后瞬时离心直扩反应体系管，然后小心打开，分别向管中直接加入 2μL 阴性对照、阳性对照、组织研磨液上清或血清样品，作好标记。

在 PCR 扩增仪（启动热盖）进行以下程序：98℃ 5min；循环 98℃ 5s，60℃ 20s，共 40 次；再 72℃ 延伸 1 min。

4、电泳：

称 3g 琼脂糖放于 500 mL 锥形瓶中，加入 50 倍稀释的 TAE 电泳缓冲液 200mL（取 4mL 50 倍 TAE 电泳缓冲液，用双蒸水稀释至 200 mL），于微波炉中溶解，再加入 10μL 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 10μL，点样于琼脂糖凝胶孔中，以 120V 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 284 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 284 bp 扩增带为 ASFV 阳性，否则为阴性。（DNA Marker 电泳图例详见图 1.）

【注意事项】

- 所有接触病料的物品均应合理处置，以免污染实验室。
- 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。
- 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。
- 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℃，以免挥发变干。**染色液使用前也应离心使液体沉于管底。
- 防止试剂盒组分受污染；试剂盒之间的成分不可混用；不要使用超过有效期限的试剂。
- 操作过程中移液、定时等全部过程必须精确。
- 反复冻融试剂将降低检测灵敏度，建议在 3 次内用完。
- 严格按试剂盒说明书操作。

【规格】24 头份/盒

【保存及有效期】B 盒于 -20℃ 保存，有效期为 12 个月。电泳试剂于室温保存，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

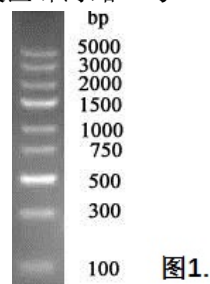


图1.