

非洲猪瘟病毒荧光 PCR 快速检测试剂盒-16 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 (African Swine Fever Virus, ASFV) 的 DNA。适用于 ASFV 的诊断、检测和流行病学调查。

【原理】

利用裂解法释放样品中的 DNA 作为模板, 在热启动 Taq 酶的作用下, 经高温变性、中温退火及延伸的多次循环后, 使扩增 DNA 片段放大了数百万倍。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】

组分	用途	数量	贮藏条件
核酸释放液	核酸释放	48 支	-20℃
反应体系管	扩增	48 支	

【需要自备的物品】

- 仪器:** 离心机、涡旋震荡器、-20℃冰箱、干式恒温器、手持电动组织研磨器、Smart 16 或 FQD-16A 或其他适用此试剂盒反应管的荧光 PCR 仪。
- 耗材:** 眼科剪、眼科镊、生理盐水、经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水处理的离心管和吸头。

【操作步骤】

- 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, 用注射器取血 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)。
- 组织样品处理:** 每份组织分别剪碎混匀后取 0.05g 于 2mL 离心管中, 使用手持电动组织研磨器研磨 30s, 再加入约 200μL 生理盐水继续研磨, 待匀浆后再加 1.3 mL 生理盐水涡旋混匀, 8000rpm 离心 2 min。

3 核酸释放

进行核酸释放前, 先将各试剂管进行瞬时离心。使用时, 分别向装有核酸释放液的小管中加入样品组织研磨液上清或血清 5μL, 涡旋混匀后瞬时离心, 放入干式恒温器中 80℃温育 2min, 取出放离心机

瞬时离心 30s, 上清即可作为模板备检。

4 核酸扩增

先取反应体系管置于室温融化后瞬时离心, 分别用移液器吸取模板 2μL 加入反应管中, 混匀并做好标记 (注意! 不要在透明管盖上做标记, 以免影响信号收集)。在荧光 PCR 扩增仪上进行以下反应: 95℃ 2min; 循环 95℃ 5s, 60℃ 15s, 共 40 次, 每次循环的第二步 (60℃ 15s) 收集荧光信号 (其中 ASFV 的报告基团为 “FAM”, 内参的报告基团为 “HEX” (如所用 PCR 仪没有 HEX 校正, 可用 VIC 代替), 淬灭基团均为 “None”)。

【结果判定】

根据荧光 PCR 仪自动分析, 内参 HEX 荧光信号 Ct 值 ≤ 33 并出现特异性扩增曲线, 实验结果成立; 被检样品若 FAM 荧光信号 Ct 值 ≤ 35 并出现特异性扩增曲线为 ASFV 阳性; 被检样品 35 ≤ Ct 值 < 40 并出现特异性扩增曲线, 需重新取样获取 DNA, 扩增后进行结果判定, 如仍是可疑, 可判定为阳性; 对于某些未呈现特异性扩增曲线, 但本底较高的样品, 应判定为阴性。

【注意事项】

- 本品仅供体外诊断用。
- 为确保检测结果准确, 请严格按照说明书操作。
- 所有用于检测的废弃物品均应放入含消毒液的废物缸内, 浸泡消毒; 实验结束后立即用 1% 次氯酸钠或 75% 酒精消毒工作台。
- 实验过程中, 避免手和手套接触管口, 若开盖时管中液体粘在手上或溅出, 应立即更换手套; 所有接触病料的物品均应合理处理。
- 所有试剂管用前于室温融化, 瞬时离心后再开盖使用。
- 反应体系管加入模板后必须离心, 保证液体全部置于管底。
- 扩增结束后, 将反应管从机器取出时, 切忌打开反应管, 避免气溶胶污染。

【规格】48 头份/盒

【保存及有效期】 所有试剂应 -20℃ 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