

## 非洲猪瘟病毒直接荧光 PCR 快速检测试剂盒-T8 使用说明书

### 【用途】

用于检测猪 EDTA 抗凝血、血浆、血清、脾脏、淋巴结和肾脏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。

### 【检测原理】

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, 同时含有基因改造筛选的快速扩增 DNA 聚合酶, 以及 UNG/dUTP 防污染体系。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
血液样品稀释液	稀释样品	90 μL×24 支	-20℃
组织样品稀释液		1 mL×25 支	
反应体系管	直接扩增	24 支	
阴性对照	质控	50 μL	
阳性对照	(可选做)	50 μL	

### 【需要自备的物品】

- 仪器:** 涡旋震荡器、-20℃冰箱、手持电动组织研磨器、T8 实时荧光定量 PCR 仪、可调移液器等。
- 耗材:** 眼科剪、眼科镊、经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水处理的灭菌离心管和吸头。

### 【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)。
- 样品处理:**
  - 阳性对照处理** 室温融化后瞬时离心。
  - 阴性对照处理** 室温融化后瞬时离心。
  - 组织样品处理** 从待检组织取 0.1g 于 2ml 离心管中, 使用手持电动组织研磨器研磨 30 秒, 再加入 200μL 组织样品稀释液继续研磨, 待匀浆后再加入 800μL 组织样品稀释液, 涡旋振荡混匀, 8000r/min 离心 2 分钟, 取上清备用。
  - EDTA 抗凝血样品处理** 取 EDTA 抗凝血 10μL, 加入血液样品稀释液中, 涡旋振荡混匀。
  - 血清、血浆样品处理** 8000r/min 离心 2 分钟,,

取上清 90μL 加入血液样品稀释液中, 涡旋振荡混匀, 涡旋振荡混匀。

### 3 实时荧光 PCR 操作

取反应体系管置于室温融化, 须瞬时离心后再开盖使用。用移液器吸取上述处理好的样品上清 2μL 加入反应体系管中, 用离心机离心 30s, 离心时注意将开盖端朝向离心机中心、盖与管连接端朝外放置。离心结束放入 T8 仪器中, 使用程序非洲猪瘟直扩 (Direct-ASFV) 进行扩增检测。

### 【结果判定】

根据 T8 快速荧光 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 (若选用阴阳性对照进行质控, 则阳性对照 Ct 值 < 30 并出现特异的扩增曲线, 阴性对照无 Ct 值且无特异的扩增曲线, 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 < 40 并出现特异性扩增曲线, 需重新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。
- 此试剂盒可使用内参作为指示, 阳性表明核酸获取、扩增均有效, 也可使用阴性对照和阳性对照进行质控, 请根据实际需要进行选择。
- 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。
- 反应体系管用前于室温融化并瞬时离心, 避免开盖时试剂溅出, 打开时请左右摇动, 将管盖先掰至 45°, 再用劲打开, 避免用力过大将管盖内颈掰断。
- 反应体系管加入样品后必须离心, 保证液体全部置于管底。
- 扩增结束后, 用取样器将反应体系管从机器取出时, 切忌打开反应体系管, 避免气溶胶污染。

### 【规格】24 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