非洲猪瘟病毒直接荧光 PCR 快速检测试剂盒-C 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。本试剂盒配备了 0.1mL 荧光 PCR 单管，也可以根据需要，选配适合自备荧光 PCR 仪要求的反应管（如 0.2mL 管、八连管等）进行扩增。

【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×48 支	-20℃
组织样品稀释液		1 mL×50 支	
反应液	直接扩增	410 μL×3 支	
阴性对照	质控（可选做）	50 μL	
阳性对照		50 μL	
0.1 mL 反应管	耗材	48 个	室温

【需要自备的物品】

1．**仪器**：离心机、涡旋震荡器、-20℃冰箱、手持电动组织研磨器（或其他研磨器具）、荧光 PCR 仪、可调移液器等。

2．**耗材**：眼科剪、眼科镊、经焦碳酸二乙酯（DEPC）水处理的离心管和吸头，适合自备荧光 PCR 仪要求的反应管。

【操作步骤】

1 **样品采集**：病死或扑杀猪，取脾脏、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）。

2 **样品处理**：

1) **阳性对照处理** 室温融化后瞬时离心。
2) **阴性对照处理** 室温融化后瞬时离心。
3) **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（或用其他研磨方式制成组织匀浆液），涡旋振荡混匀，8000r/min 离心 2 分钟，取上清备用。
4) **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。
5) **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。

3 **实时荧光 PCR 操作**

先取反应液置于室温融化后瞬时离心，用移液器吸取 23μL 分装至反应管中，再分别加入 2μL 上述处理好的样品上清，混匀并做好标记。在荧光 PCR 扩增仪上进行以下反应：50℃ 2min，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（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 值＜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】

1. 本品仅供体外诊断用。
2. **此试剂盒可使用内参作为质控指示，阳性表明核酸获取、扩增均有效；也可根据实际工作需要，选择使用阴性对照和阳性对照进行质控。**
3. 为确保检测结果准确，请严格按照说明书操作。
4. 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。
5. 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。
6. 所有试剂管用前于室温融化，瞬时离心后再开盖使用。
7. 设置扩增程序时，若仪器对时间设置有最低限制，可根据情况适当延长反应时间。
8. 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