

猪伪狂犬病毒单重实时荧光 PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

本试剂盒采用探针法单重实时荧光 PCR 方法检测猪全血、血清、精液、大脑海马背侧皮层、中脑、脑桥、三叉神经节、肺脏、淋巴结、鼻拭子及细胞培养物等样品中猪伪狂犬病毒(PRV)的 DNA, 适用于猪伪狂犬流行病毒的检测。AD-003-0 为普通探针法检测试剂盒; AD-003-1 为防污染体系检测试剂盒, 添加 dUTP 和 UNG 酶可有效减少气溶胶等的污染, 降低假阳性风险。

【原理】

提取样品 DNA 作为模板, 通过探针法荧光定量 PCR 检测猪伪狂犬 gH 蛋白基因, 判定样品中是否存在猪伪狂犬病毒的核酸。

【试剂盒组成】

组成	100 头份	贮藏条件
阴性对照 (无核酸酶水)	1 mL	-20℃
阳性对照	20 μ L	
PCR 反应液	900 μ L	
荧光探针	220 μ L	
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、双/四通道荧光 PCR 扩增仪、匀浆仪、-20℃冰箱、可调移液器 (2 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L)。
3. **耗材:** 荧光 PCR 反应管、吸头 (10 μ L、200 μ L、1000 μ L)。

【使用注意事项】

- 建议与源微生物提供的柱式或磁珠法病毒核酸提取试剂盒配套使用。
- 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; 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。
- 所有试剂应在规定条件下储存, 冻存的试剂使用前应完全融化、混匀, 瞬时离心 15 s, 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℃冻存。
- 注意防止试剂盒各组分污染。
- 严格遵守操作说明, 操作过程中移液、定时等全部过程必须精确。
- 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。

- 避免反复冻融试剂降低检测灵敏度，本试剂盒应尽量在 3 次内用完。
- 本试剂盒无法区分流行毒株和基因缺失型毒株。

【样品采集】

组织样品：按规范采集大脑海马背侧皮层、中脑、脑桥、三叉神经节、肺脏、淋巴结等样品约 3 cm×3 cm 大小，扁桃体整体采集。

液体样品：按规范采集抗凝血样品 5 mL，鼻拭子保存液 3 mL，精液样品 5-10 mL。

细胞培养物样品：反复冻融 3 次后第 3 次解冻后保存备用。

【样品处理】

抗凝血、血清、精液或鼻拭子保存液等液体样品：无需特殊处理直接取 200 μ L 进行核酸提取。

组织样品：取适当大小的样品放入装有 2 mL PBS 的研磨管中，使用研磨仪等充分研磨，制成组织匀浆液，6000 $\times$ g 离心 5 min，取上清液 200 μ L 进行核酸提取。

细胞培养物：1500 $\times$ g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min，取上清液 200 μ L 进行核酸提取。

【核酸提取】

采用离心柱法或者磁珠法病毒核酸提取试剂盒等提取样品中的核酸，低温保存、待检。建议每次提取做一个阳性样品和阴性样品的提取对照。

【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	8 $\times$ (N+1) μ L
PCR 反应液	8 $\times$ (N+1) μ L
引物、荧光探针混合液	2 $\times$ (N+1) μ L

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 μ L。

分别取 2 μ L 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 $^{\circ}$ C 2 min；循环 95 $^{\circ}$ C 10 s，60 $^{\circ}$ C 35 s，共 40 次，每次循环的第二步（60 $^{\circ}$ C 35 s）收集荧光信号（报告基团“Cy5”，淬灭基团“None”）。防污染体系在预变性步骤（95 $^{\circ}$ C 2 min）之前进行消化步骤 50 $^{\circ}$ C 5 min。

【结果判定】

1. 结果分析条件设定

阈值设定原则：仪器自动生成，或者根据具体扩增曲线或仪器噪音情况进行适当调整。

2. 试验成立条件

阳性对照 gH 基因的 Ct 值均 <35 且出现特异性扩增曲线，阴性对照均无 Ct 值或者 Ct 值 $\geq$ 35 且无特异性扩增曲线，判为试验有效。试验无效时应重新进行试验。

3. 结果描述及判定

gH 基因（Cy5 通道）被检样品 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为 PRV gH 基因阳性，样品中存在猪伪狂犬病毒核酸；无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为 PRV gH 基因阴

性，样品中不存在猪伪狂犬病毒核酸； $35 \leq \text{Ct 值} < 40$ 并出现特异的扩增曲线，判为 PRV gH 基因疑似，对疑似样品，需重新取样提取 DNA，进行复检，Ct 值 < 40 判为阳性，否则判为阴性。

【规格】 100 头份/盒

【保存及有效期】 于 -20°C 以下保存，有效期为 12 个月。