

非洲猪瘟病毒实时荧光 PCR 直接扩增检测试剂盒使用说明书

【用途】

本试剂盒采用探针法双重实时荧光 PCR 直接扩增方法检测猪血清、血浆、唾液等样品中非洲猪瘟病毒（ASFV）的 DNA，无需核酸提取直接对样品进行扩增进行非洲猪瘟病毒的检测，同时添加 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】

根据非洲猪瘟 DNA 上的 P72 蛋白基因的特异片段设计引物及 FAM 探针，同时在猪内源特异片段基因上设计引物及 HEX 探针作为内质控，在同一反应管内进行目的基因和内质控的双重检测，判定是否感染非洲猪瘟病毒；优化的抗抑制 PCR 检测体系，不受样本中的杂质干扰直接进行血清、血浆或唾液等液体样本的直接扩增检测。

【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°C
阳性对照	20 μ L	
PCR 反应液	900 μ L	
非洲猪瘟引物、探针、内质控混合液*	900 μ L	
说明书	1 份	

*内质控混合液中包括其引物、探针。

【需要自备的器材】

- **试剂：**核酸提取试剂。
- **仪器：**离心机、双/四通道荧光 PCR 扩增仪、匀浆仪、-20°C 冰箱、可调移液器（2 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L）。
- **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】

- 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 15s，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°C 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猪和基因缺失型毒猪。

【样品采集】

液体样品：按规范采集无菌血清或血浆 1-3 mL，唾液样品 1-3 mL。

【样品处理】

血清或血浆样品采集时避免发生溶血，唾液样品中如有饲料残渣等建议 8000×g 离心 2 min 分离上清作为样品；样品无需核酸提取。

【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
PCR 反应液	8× (N+1) μL
非洲猪瘟引物、探针、内质控混合液	8× (N+1) μL

将以上配制的反应体系充分混匀后，分装每个反应管中各 16 μL。

分别取 4 μL 样品，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：50 °C 2 min, 95 °C 2 min; 循环 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 45 次，每次循环的第二步（60 °C 30 s）收集荧光信号。（报告基因“非洲猪瘟基因-FAM、内质控-HEX”，淬灭基团“None”使用 ABI 7500 仪器时，由于无 HEX 通道建议用 VIC 通道代替，退火时间设置至少为 31 s）。

【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 P72 基因及内质控基因的 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 ≥35 且无特异性扩增曲线，判为试验有效。试验无效时应仔细检查操作步骤或试剂后重新进行试验。

3. 结果描述及判定

FAM 通道和 HEX 通道被检样品 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为非洲猪瘟阳性，样品中存在非洲猪瘟病毒核酸。FAM 通道无 Ct 值且无特异的扩增曲线，HEX 通道 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为非洲猪瘟阴性，样品中不存在非洲猪瘟病毒核酸；FAM 通道 35 ≤ Ct 值 <40 并出现特异的扩增曲线，HEX 通道 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为非洲猪瘟疑似，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。

综合判定结果见下表

综合判定结果	检测结果	
	FAM	HEX
ASFV 阳性	+	+/-

YuanWei

源微生物

ASFV 阴性	—	+
阳性质控失效或漏加	—	+
试剂失效或者体系配制错误等	—	—

注：“+”代表检测阳性；“—”代表检测阴性。

【规格】 100 头份/盒

【保存及有效期】 于-20℃ 以下保存，有效期为 12 个月。