

猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪轮状病毒多重实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒

使用说明书

【用途】

本试剂盒采用探针法多重实时荧光 RT-PCR 方法检测母猪乳汁、排泄物、肛门拭子及细胞培养物等样品中猪流行性腹泻病毒（PEDV）、猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）和猪轮状病毒（PRoV）的 RNA，适用于猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪轮状病毒的检测。

【原理】

根据猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪轮状病毒的基因特异片段分别设计引物及荧光探针（PDEV-FAM、TGEV-CY5、PRoV-ROX），同时在猪基因特异片段上设计内质控引物及 HEX 荧光探针，以样品核酸作为模板，在同一反应管内进行三种目的基因和内质控基因的多重 RT-PCR 检测。扩增试剂中添加 dUTP 和温度敏感型 UNG 酶可有效减少气溶胶等的污染，降低假阳性风险。

【试剂盒组成】

组成	100 头份	贮藏条件
阴性对照（ddH ₂ O）	1 mL	-20℃
阳性对照（PTC）	20 μL	
20×反转录酶混合液（酶 Mix）	110 μL	
2.5×PTP qPCR 反应液*1（qMix）	850 μL	
2.5×PTP 引物及探针混合液*2（引物 Mix）	850 μL	
说明书	1 份	

*1：PTP 为猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪轮状病毒英文简称 PEDV、TGEV、PRoV 首字母缩略而来。

*2：该引物及探针混合液中包含猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪轮状病毒和猪源内质控的引物、探针等，该混合液使用及保存时请尽量避免光。

【需要自备的器材】

- **试剂：**核酸提取试剂。
- **仪器：**离心机、四通道荧光 PCR 扩增仪、匀浆仪、-20℃冰箱、可调移液器（2.5 μL、10 μL、20 μL、200 μL、1000 μL）。
- **耗材：**荧光 PCR 反应管、吸头（10 μL、200 μL、1000 μL）。

【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，一个月内频繁使用可将试剂盒暂存于 4℃。

【样品采集】

- **组织样品：**按规范采集粪便或死亡仔猪肠道组织等样品。
- **液体样品：**按规范采集无菌母猪乳汁 3 mL。
- **拭子样本：**按规范采集肛门拭子。

【样品处理】

- **组织样品：**用无菌剪刀剪取约 0.5cm×0.5cm 充血、出血、肠壁变薄、含多量水样粪便等病变明显的小肠组织，加入 0.8ml-1.0ml 的 PBS 混匀，组

织匀浆器或研钵中充分匀浆或研磨，将组织混悬液转入无菌 EP 管中，反复冻融两次，4℃条件下 14600×g 离心 10 min，取上清液 200 μL 进行核酸提取。

- **肛门拭子样品：**将肛门拭子放在盛有 0.8ml 灭菌 PBS 的无菌 EP 管中，涡旋振荡 10min，反复冻融两次，4℃条件下 14600×g 离心 10 min，取上清液 200 μL 进行核酸提取。
- **液体样品：**将乳汁转移到无菌 EP 管中，反复冻融两次，4℃条件下 14600×g 离心 10 min，取上清液 200 μL 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
20×反转录酶混合液	1× (N+1) μL
2.5×PTP qPCR 反应液	8× (N+1) μL
2.5×PTP 引物及探针混合液	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 17 μL。取 3 μL 模板 DNA/RNA，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：UNG 酶消化 25 °C 5 min，反转录 55 °C 5 min，预变性 95 °C 2 min；循环 95 °C 5 s，60 °C 30 s，共 40 次，每次循环的第二步（60 °C 30 s）收集荧光信号（报告基团“FAM、HEX、ROX、Cy5”，淬灭基团“None”）。

【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

阳性对照四种通道的 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试剂或操作后重新进行试验。

3. 结果描述及判定

FAM 通道被检样品 Ct 值<35 并出现特异的扩增曲线，判为 PEDV 阳性，样本中存在猪流行性腹泻病毒核酸；无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为 PEDV 阴性，样本中不存在猪流行性腹泻病毒核酸；35≤Ct 值<40 并出现特异的扩增曲线，判为 PEDV 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。

ROX 通道被检样品 Ct 值<35 并出现特异的扩增曲线，判为 PRoV 阳性，样本中存在猪痘病毒核酸；无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为 PRoV 阴性，样本中不存在猪痘病毒核酸；35≤Ct 值<40 并出现特异的扩增曲线，判为 PRoV 疑似，对疑似样品，需重新取样提取 RNA，进行复检，Ct 值<40 判为阳性，否则判为阴性。

Cy5 通道被检样品 Ct 值<35 并出现特异的扩增曲线，判为 TGEV 阳性，样本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 TGEV 阴性，样本中不存在猪伪狂犬病毒核酸；35≤Ct 值<40 并出现特异的扩增曲线，判为 TGEV 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。

HEX 通道为内质控通道，通常检测结果为 Ct 值<35 出现特异的扩增曲线，判为阳性，但当目标检测病毒核酸浓度较高时，存在由于反应体系内部竞争导致 HEX 通道检测结果为阴性的可能。

综合判定结果见下表

综合判定结果	检测结果			
	PEDV-FAM	IC-HEX	PRoV-ROX	TGEV-Cy5
样本中三种病毒核酸阳性	+	+/-	+	+
PEDV、PRoV 核酸阳性	+	+/-	+	-
TGEV、PRoV 核酸阳性	-	+/-	+	+
PEDV、TGEV 核酸阳性	+	+/-	-	+
PEDV 核酸阳性	+	+/-	-	-
TGEV 核酸阳性	-	+/-	-	+

PRoV 核酸阳性	—	+/-	+	—
三种病毒核酸阴性	—	+	—	—
试剂失效或操作失误	-	—	—	-

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。