

双通道非洲猪瘟病毒荧光定量 PCR 检测试剂盒说明书

【名称】

中文名：双通道非洲猪瘟病毒荧光定量 PCR 检测试剂盒

英文名：African Swine Fever Virus Real-time PCR Detection Kit

【货号及规格】 EK-9021-50T

【贮藏与有效期】 -20°C以下保存，有效期为 12 个月。

【主要成分与含量】

序号	产品组分	规格 (50 头份/盒)	贮存温度
1	裂解液	1 管 (1ml/管)	-20°C
2	荧光 PCR 反应液	2 管 (500µl/管)	-20°C
3	阳性对照	1 管 (50µl/管)	-20°C
4	阴性对照	1 管 (50µl/管)	-20°C
5	说明书	1 份	

【用法与判定】

- 核酸提取步骤：**取拭子或血样 10µl 加入裂解液 10µl 充分混匀后于室温或 56°C 处理 10min 后再 95°C 加热 5min。取 5µl 上清用于下游检测扩增。为获取更优结果，可考虑使用柱法或磁珠法提取试剂盒提取核酸。
- PCR 操作步骤**
 - 取出试剂盒，将试剂盒置室温（冰上溶解更优）各试剂完全溶解并混匀。
 - 取需要数量的 PCR 管，取 20µl PCR 反应液至每个反应管内，然后加 5µl 所提取的样品核酸，每个反应总体积为 25µl。每次检测应设立阳性对照和阴性对照，在荧光定量 PCR 仪上进行扩增检测。
 - 将各 PCR 管放置在仪器槽的相应位置，并记录放置顺序，按下表设置仪器核酸扩增相关参数，进行 PCR 扩增。

体系	25µl 反应体系
信号通道	FAM 和 VIC 采集荧光信号

PCR 反应条件	阶段	条件	循环数
	1	95°C: 3min	1
	2	95°C: 15s	40 (此阶段采集 FAM 和 VIC 荧光信号)
60°C: 30s			

3. 结果判定

3.1 阴性对照：1) FAM 与 VIC 通道均无扩增曲线，偶有翘尾 ($C_t \geq 38$) 属于正常；

3.2 阳性对照：

1) FAM 通道应有扩增曲线，且其 C_t 值 < 33 ；FAM 通道 C_t 值 ≥ 33 时，检测试剂或者阳性参考品可能存在问题，应重新实验，此时若样本孔根据判读标准为阳性，结果为阳性；

2) VIC 通道应有扩增曲线且其 C_t 值 < 32 ；VIC 通道 C_t 值 ≥ 32 时，检测试剂或者阳性参考品存在问题，应重新实验，此时若样本孔根据判读标准为阳性，结果为阳性；

3.3 样本：

1) VIC 通道 C_t 值 > 36 ；如 FAM 通道 C_t 值 ≤ 38 ，则结果为阳性；如 FAM 通道 $C_t > 38$ 或者没有扩增曲线，则样本投入量过少或者存在 PCR 抑制剂，建议重新取样；

2) VIC 通道 C_t 值 ≤ 36 ；如 FAM 通道 C_t 值 ≤ 38 ，则结果为阳性；如 FAM 通道 $C_t > 38$ 或者没有扩增曲线，则结果为阴性。若被检样品 FAM 通道 $38 < C_t \leq 40$ ，判定为可疑。应对样本进行复测，若复测结果 C_t 值仍在 38-40 之间，有明显指数增长，则判定为阳性，否则为阴性。

*注：VIC 通道为猪内参信号，FAM 为非瘟病毒信号。阳性结果应该是明细扩增曲线，如果应该增幅低且扩增曲线不明显，应为非特异性扩增。

【注意事项】

- 严格按照使用说明书进行操作。使用前应将各试剂完全溶化，充分振荡混匀，瞬时离心应尽量吸取液体上层。
- 试剂盒不同组间不得交叉，防止污染。
- 避免反复冻融。
- PCR 产物均应合理处理，以免造成污染。