

非洲猪瘟病毒荧光 PCR 检测试剂盒说明书

兽用

【产品名称】

通用名称：非洲猪瘟病毒荧光 PCR 检测试剂盒

汉语拼音： Feizhou Zhuwen Bingdu Yingguang PCR Jiance Shijihe

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

商品名称： 非洲猪瘟病毒核酸检测试剂盒(荧光定量 PCR 法)

【产品型号/规格】

型号： BW-Q0101；规格： 48 头份/盒。

【作用与用途】

本试剂盒为双通道荧光定量 PCR 反应预混液，反应预混液中含有一对非洲猪瘟病毒基因组特异性结合的引物及相应探针（报告基团为 FAM），和一对家猪基因组内参基因特异性引物及相应探针（报告基团为 VIC），以及进行 PCR 扩增所需的酶和反应体系等。

试剂盒用于对猪血液、血浆、血清、组织样(肌肉、肝脏、脾、淋巴结等)、拭子、粪便、饲料、污水等来源的核酸提取物中非洲猪瘟病毒核酸的检测。

【产品组成】

成分/名称	规格
PCR 反应预混液	2 × 500 μL
阳性对照	100 μL
阴性对照	100 μL
说明书	1 份

【储存条件及有效期】

试剂盒低温冷藏运输，-20℃保存。产品有效期 12 个月。

反复冻融可能导致产品性能下降，使用时应避免反复冻融 3 次以上。

【样本要求】

- 血液/血浆/血清样本：使用无菌注射液抽取样品置于离心管中用于核酸提取。
- 组装样品：取少量样品于研钵或匀浆器中研磨，然后将研磨匀浆转入无菌离心管中，5000 rpm/min 离心 10 分钟，取上清用于核酸提取。
- 拭子、分泌物等样品：在装有拭子或分泌物的离心管中加入 500 μL PBS 或生理盐水，剧烈振荡 30 s。棉拭子尽量挤出液体转移到无 DNA 酶污染的离心管中





用于核酸提取。

- 粪便、饲料等样品：取适量的粪便、饲料放入盛有 PBS 缓冲液的研磨管中，6000 rpm/min 震荡研磨 45 秒，制成约 10%的匀浆液，5000 rpm/min 离心 5 分钟，取上清液用于核酸提取。
- 污水样品：直接取样进行核酸提取。
- 样本存放及运送：待测样本在 2-8°C保存不应超过 18h；-20±5°C保存不应超过 1 个月；如需长期保存，样本应冻存于-80°C以下，避免反复冻融。样本运输应采用泡沫盒加冰袋密封运输。

【注意事项】

- 整个检测过程应严格按照说明书要求分别在带压力控制的标准 PCR 实验室的试剂准备区、样本处理区和检测区进行操作，各区实验服、仪器、耗材应独立使用，不能混用；实验用吸头采用带滤芯吸头；样本处理区应配有生物安全柜，样本处理在生物安全柜中进行操作；不同分区均应配备紫外线杀菌装置。
- 每次实验应该设置阴、阳性对照。
- 试剂盒所有试剂在使用前应该在常温下充分融化，涡旋混匀并瞬时离心。
- 试剂盒内所配阳性对照应单独存放在样本准备区，不能进入试剂准备区。
- 为防止荧光干扰，应避免裸手直接接触 PCR 反应管，并应避免在 PCR 反应管上进行任何标记。
- 仪器扩增相关参数应按照本说明书相关要求设置；不同批号试剂不能混用。
- 实验前请仔细阅读本说明书，准备好所有的必要实验材料和试剂，熟悉每一步操作步骤，并穿戴合适的个人防护装备(如长袍、手套、护目镜)。
- 实验过程中产品的废弃物应该进行无害化处理后方可丢弃。

【适用机型】

核酸扩增仪：TL Gentier 96E、TL Gentier 48E、杭州博日 FQD-96A、上海宏石 SLAN96、ABI7500、ABI7300 plus、QuantStudio 3、QuantStudio 5、Biorad CFX-96 等荧光定量 PCR 仪。

【用法与判定】

1. 样本核酸提取(样本处理区)

在样本处理区操作：按照核酸提取试剂盒（自备）说明书提取待测**样本核酸**。

2. 试剂准备(试剂准备区)

在试剂准备区操作：从冰箱取出检测试剂，室温放置至完全溶解后，涡旋混匀并瞬时离心以去除管壁附着液体。取 N（N=待测样本数量+阴性质控品+阳性质控品）个 PCR 反应管，每管加入 **20 μL PCR 反应预混液**。



3. 加样(样本处理区)

在样本处理区操作：在上述含 20 μL PCR 反应预混液的 PCR 管中加入 **10 μL** 第 1 步提取的**核酸样本**；在**阴性对照**和**阳性对照** PCR 管中分别加入 **10 μL** 试剂盒中的**阴性对照**或**阳性对照**；PCR 反应管总体积为 30 μL 。盖好 PCR 管盖，混匀并瞬时离心后转入检测区。

4. PCR 扩增(检测区)

以下在检测区进行操作：

4.1 将含有样本和反应液的 PCR 管放置在实时荧光定量 PCR 仪中，并记录放置顺序。

4.2 按下表参数进行 PCR 扩增，在“退火、延伸”步骤采集 FAM 及 VIC 通道荧光信号。

步骤	温度	时间	循环数	
1	UNG 酶处理	50°C	2 min	1
2	预变性	95°C	5 min	1
3	变性	95°C	10 s	45
4	退火、延伸，荧光采集	60°C	30 s	
5	冷却	10°C	10 s	1

4.3 扩增产物按规定进行无害化处理后方可丢弃。

5. 结果判定

5.1 试剂盒有效性判定

(1) 阳性对照：有典型 S 型扩增曲线，FAM 通道 Ct 值 ≤ 25 。

(2) 阴性对照：Ct 值 > 40 或无任何 Ct 值，荧光信号为直线或轻微斜线，无指数增长期。

场景	阳性对照	阴性对照	判定结果
1	有典型 S 型扩增曲线，FAM 通道 Ct 值 ≤ 25 。	Ct 值 > 40 或无任何 Ct 值，荧光信号为直线或轻微斜线，无指数增长期。	试剂盒有效
2	有典型 S 型扩增曲线，FAM 通道 Ct 值 ≤ 25 。	Ct 值 ≤ 40 ，有明显指数增长期	试剂盒有效 ，但样本处理或操作环节存在污染
3	FAM 通道 Ct 值 > 25 。	/	试剂盒性能下降或失效

5.2. 检测结果判定

5.2.1 对于血液、组织、拭子等生物样本，首先检查所测样本 VIC 通道 Ct 值，若 Ct 值 > 30 则判定该样本检测失败，需检查 PCR 反应体系或样本核酸提取过程是否存在问题。若 Ct 值 ≤ 30 ，进一步根据 5.2.3 进行结果判定。





5.2.2 对于污水、粪便、饲料等可能不含内参基因的环境样本，直接根据 FAM 通道 Ct 值来判定是否检出非洲猪瘟病毒，根据 5.2.3 进行结果判定。

5.2.3 当条件同时满足 5.1 和 5.2.1，或 5.1 和 5.2.2 时，根据 FAM 通道的 Ct 值来判定是否在样本中检出非洲猪瘟病毒，具体判定结果见下表：

判读前提	FAM 通道 Ct 值	判定结果
试剂盒判定有效(见 5.1)，且： 血液、组织、拭子等生物样本 Ct 值 ≤ 30 (见 5.2.1) 或 污水、粪便、饲料等环境样本 (见 5.2.2)。	≤35	阳性
	35~40	可疑，需重测
	无 Ct 或 >40	阴性

5.2.4 对于 FAM 通道 Ct 值在 35~40 之间的样本，需重新进行 PCR 扩增检测。若重复实验结果 Ct 值仍 ≤40，且有明显指数增长期，则判定为阳性；否则为阴性。

【检测方法的局限性】

- 本试剂盒最低可检测 500 个病毒拷贝/mL 样本，当检测样本中被检核酸浓度低于本试剂盒的检出限时可能会发生假阴性的结果。
- 被检样本在采集、运输、储存以及处理过程中操作方式不当可能造成 DNA 降解而产生假阴性结果。
- 核酸提取试剂盒性能下降或提取试剂失效也可能造成假阴性结果。
- 若样本采集、运输、储存及处理过程中发生交叉污染，则可能得到假阳性结果。

购买须知

根据说明书使用时，本产品保证性能符合产品标示和倍沃文献中的描述。倍沃不提供任何其他类型的明示或暗示保证，包括但不限于适销性或特定用途适用性等。倍沃对违反本保证的唯一义务和购买者的唯一补救措施是由倍沃选择更换产品。倍沃对因使用产品、使用产品结果或无法使用产品而引起的任何直接、间接、后果性或附带损害不承担任何责任。如需技术支持或了解更多产品信息，请致电 400-115-2855 与我们联系，或访问我们的网站 www.beiwobiomedical.com。

