

旋达[®]R1动物病害检测系列

非洲猪瘟病毒（ASFV）核酸检测试剂盒（带内参，PCR-荧光探针法）

请于-20℃条件下保存，有效期15个月

◆ 产品说明

旋达[®]R1本试剂盒适用于猪血清、血浆、抗凝血、口腔黏液及肺、淋巴结、肾脏、骨髓和扁桃体组织等样品中非洲猪瘟病毒的特异检测，适用于非洲猪瘟病毒（ASFV）的辅助诊断、监测及流行病学调查，检测结果仅供临床参考，检出限为 10^1 copies/μL基因组 DNA。

◆ 产品组成（48 测试）

036022M	
试剂	含量
A-ASFV/Sus-P	20μL × 8 管 × 6 排
NG-P	100μL × 2 支
PG-ASFV/Sus-P	100μL × 1 支
Sus-P	100μL × 1 支

◆ 适用仪器

ABI 7500、CFX 96、Mx 3005P、LineGene 9600 等实时荧光 PCR 仪。

◆ 自备耗材和仪器

①冰盒；②移液器（0.5-10μL，10-100μL，100-1000μL）及配套灭菌吸头；③离心机；④涡旋混匀器；⑤金属浴；⑥均质机、搅拌机或研钵等研磨器具；⑦电子天平。

◆ 注意事项

1. 本试剂检测灵敏度高。为了防止污染，实验要分区操作。
 - 1) 第一区：样本制备区。
 - 2) 第二区：模板添加区。
 - 3) 第三区：扩增及产物分析区。

★ 分区之间最好进行物理性隔离，避免人为因素造成的污染。
2. 实验过程中穿戴工作服和乳胶手套，不同区域独立使用工具，需更换手套和实验服。
3. 严格按照操作步骤操作，试剂配制和加样等步骤请严格按照说明书要求在冰盒上操作。
4. 反应液中的成分对光敏感，应**避光保存**。试剂使用前要完全解冻，但应避免反复冻融，推荐使用前离心 30 秒。
5. 反应结束后，扩增管请置于密封袋内丢弃，当日清理，开盖易造成气溶胶污染，禁止开盖。
6. 不同批号试剂请勿混合使用，在有效期内使用。
7. 鉴于 ASFV 为一类检疫性疫病，上述操作应在相关生物安全设施内进行。对样品及其废弃物的操作应严格遵守生物安全规定。
8. 本试剂盒仅供研究使用，不用于临床诊断。

◆ 样品处理

参照相关标准采集样品，短期保存于-20℃，长期保存请放置于-80℃。

1. 样品的采集、处理和保存

采样过程中样本不得交叉污染，采样及样品前处理过程中须戴一次性手套。

样品采集后，放入密闭的塑料袋内（一个采样点的样品放一个塑料袋），置保温箱中加冰、密封，24 h 内送到实验室。

2. 样品处理

血液和唾液样品可直接用于核酸提取；淋巴结、脾脏、扁桃体、肌肉等样品，用无菌的剪刀和镊子剪取待检样

品 2 g 于研钵中充分研磨，再加 10 mL PBS (pH 7.2, 含 1 万单位青霉素和 1 万单位链霉素)，混匀 (样品不足 2 g 按 1:5 比例加 PBS)，对处理的待检样品置 70℃, 30 min 灭活后, 3 000 r/min, 4℃离心 5 min, 取上清液, 编号备用; 血球粉处理方法同上, 省掉研磨步骤。

针对环境拭子等猪内源性 DNA 含量极低或几乎没有的样品, 可在核酸提取时在裂解液中另加入 10μL 的 *Sus*-P 作为内部对照。

3. 样品存放

采集或处理好的样品在 2℃~8℃条件下保存应不超过 24 h; 若需长期保存, 须放置-80℃冰箱, 但应避免反复冻融 (冻融不超过 3 次)。

◆ 实验操作

1. 模板制备 (样本制备区)

建议使用商品化病毒 DNA/RNA 提取试剂盒, 具体过程详见产品说明书。

2. 添加模板 (模板添加区, 放置于冰盒上进行)

剪下所需测试数的已含有反应液的 PCR 管, 放置在室温待解冻后, 离心 30 秒后揭开封口膜, 向每管反应液中分别加入 5μL 模板, 顺序为 NG、待测样品模板、PG-ASFV/*Sus*-P。盖好配套的 PCR 管盖后, 涡旋混匀 30s, 离心 1min, 立即进行 PCR 扩增反应。

3. 扩增反应 (扩增及产物分析区)

使用荧光定量 PCR 仪, ASFV 荧光基团选择 FAM, 淬灭基团选择 NFQ-MGB; 内部对照 (*Sus*) 荧光基团选择 VIC, 淬灭基团选择 NFQ-MGB。

按下列条件设置扩增反应:

PCR 循环			荧光收集位点
50℃	2min	1 个循环	—
95℃	20 秒	1 个循环	—
95℃	10 秒	45 个循环	—
60℃	30 秒		※

其他仪器请参照仪器说明书进行设置。

4. 基线和阈值设定

进行软件设置时, 为目标基因 ASFV 和内参控制 *Sus* 单独设置特定的荧光通道。基线调整取 3-15 个循环的荧光信号, 阈值线应超过阴性对照扩增曲线的最高点。

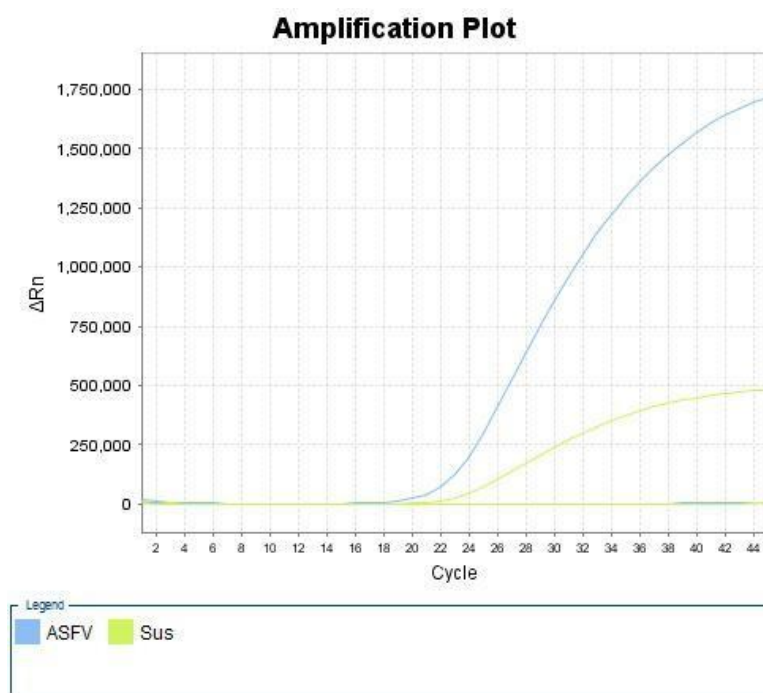
◆ 结果判定

FAM 通道 Ct<45, VIC 通道 Ct<45, 曲线呈“S”型扩增曲线, 可直接报告样品阳性, 含有非洲猪瘟病毒 (ASFV);

FAM 通道无 Ct 值, 曲线为直线或轻微斜线, 无“S”型扩增曲线; VIC 通道 Ct<45, 曲线呈“S”型扩增曲线, 可报告样品阴性, 不含有非洲猪瘟病毒 (ASFV) 或含量低于检出限;

FAM 通道和 VIC 通道均无 Ct 值, 曲线为直线或轻微斜线, 无“S”型扩增曲线, 此次实验结果无效, 提示样品添加、提取或 PCR 加样等环节可能出现的问题。建议用 PCR 级水将样品核酸进行 5 倍稀释后, 与未稀释的 DNA 样品同时进行复检。如实验仍无效, 则需重新提取 DNA 后进行实验。

NG 反应为平滑直线, PG 反应为“S”型扩增曲线, 此次检测结果有效, 否则无效。如重复检测结果仍无效, 请与技术支持人员联系。



参考结果图

◆ 企业信息

广州双螺旋基因技术有限公司

网址: www.dhelix.cn

电话: 020-85671013

传真: 020-34037175

地址: 广州国际生物岛螺旋四路 7 号标准产业单元二期第三栋第三层 302 单元