

## 非洲猪瘟流行野毒、MGF360-505R 缺失毒和 CD2V 与 MGF360-505R 联合缺失毒三重实时荧光 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 PCR 方法检测猪全血、血清、淋巴结、脾脏、肾脏、扁桃体、骨髓及口鼻拭子等样品中非洲猪瘟病毒（ASFV）的 DNA，适用于非洲猪瘟流行野毒及 MGF360-505R 缺失毒和 CD2V 与 MGF360-505R 联合缺失毒的检测。

### 【原理】

提取样品 DNA 作为模板，通过实时荧光定量 PCR 检测三种不同标记的特异荧光探针信号，判定样品中是否存在非洲猪瘟流行野毒或 MGF360-505R 缺失毒或 CD2V 与 MGF360-505R 联合缺失毒的核酸。

### 【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 $\mu$ L	
PCR 反应液	900 $\mu$ L	
荧光探针	650 $\mu$ L	
说明书	1 份	

### 【需要自备的器材】

1. **试剂：**核酸提取试剂。
2. **仪器：**离心机、四通道荧光 PCR 扩增仪、匀浆仪、-20 °C 冰箱、可调移液器（2  $\mu$ L、20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L）。
3. **耗材：**荧光 PCR 反应管、吸头（10  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L）。

### 【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 °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。

### 【样品采集】

组织样品：按规范采集脾脏、淋巴结、肾脏等样品约 3 cm×3 cm 大小，骨髓样品长度约 3 cm，扁桃体整体采集。

液体样品：按规范采集无菌抗凝血或血清 5 mL，口鼻拭子保存液样品 3 mL。

### 【样品处理】

组织样品：取适量样品于研磨管中，加入 1000 IU/mL 青霉素和链霉素、0.1 mol/L PBS（pH 7.4），使用研磨仪等充分研磨，制成 10% 组织匀浆液，400×g 离心 10 min，取上清液 200 μL 进行核酸提取。

抗凝血、血清或口鼻拭子保存液等液体样品：无需特殊处理直接取 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
无菌无核酸酶水	4× (N+1) μL
PCR 反应液	8× (N+1) μL
引物、荧光探针混合液	6× (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 18 μL。

分别取 2 μL 模板 DNA，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：95 °C 2 min；循环 95 °C 10 s，58 °C 35 s，共 40 次，每次循环的第二步（58 °C 35 s）收集荧光信号（报告基团“FAM、HEX、ROX”，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 P72、CD2V、MGF360-505R 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

P72 基因（FAM 通道）被检样品 Ct 值 < 35 并出现特异的扩增曲线，判为 ASFV P72 基因阳性，样品中存在非洲猪瘟病毒核酸；无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为 ASFV P72 基因阴性，样品中不存在非洲猪瘟病毒核酸；35 ≤ Ct 值 < 40 并出现特异的扩增曲线，判为 ASFV P72 基因疑似，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。

CD2V 基因 (ROX 通道) 被检样品 Ct 值 < 35 并出现特异的扩增曲线, 判为 ASFV CD2V 基因阳性; 无 Ct 值且无特异的扩增曲线, 判为 ASFV CD2V 基因阴性;  $35 \leq \text{Ct 值} < 40$  并出现特异的扩增曲线, 判为 ASFV CD2 基因疑似, 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。

MGF 360-505R 基因 (HEX 通道) 被检样品 Ct 值 < 35 并出现特异的扩增曲线, 判为 MGF 360-505R 基因阳性; 无 Ct 值且无特异的扩增曲线, 判为 MGF 360-505R 基因阴性;  $35 \leq \text{Ct 值} < 40$  并出现特异的扩增曲线, 判为 MGF 360-505R 基因疑似, 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		
	P72-FAM	CD2V-ROX	MGF-HEX
ASFV 流行毒株阳性	+	+	+
ASFV CD2V 基因缺失株阳性	+	-	+
ASFV MGF 基因缺失株阳性	+	+	-
ASFV CD2V 与 MGF 基因双缺失株阳性	+	-	-
ASFV 阴性、试剂失效或者操作错误	-	-	-

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°C 以下保存, 有效期为 12 个月。