

猪蓝耳病毒单重实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

本试剂盒采用探针法单重实时荧光 RT-PCR 方法检测猪血清、淋巴结、脾脏、肺脏、扁桃体、肺灌洗液、口腔拭子及细胞培养物等样品中猪蓝耳病毒（即猪繁殖与呼吸综合征病毒，PRRSV）的 RNA，适用于猪蓝耳病毒的检测。AD-004-0 为普通探针法；AD-004-1 为防污染体系，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。

【原理】

提取样品 RNA 作为模板，通过实时荧光定量 RT-PCR 检测特异荧光探针信号，判定样品中是否存在猪蓝耳病毒的核酸。

【试剂盒组成】

组成	100 头份	贮藏条件
反转录酶混合液	110 μ L	-20°C
阴性对照（无核酸酶水）	1 mL	
阳性对照	20 μ L	
PCR 反应液	900 μ L	
荧光探针	220 μ 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、双/四通道荧光 PCR 扩增仪、匀浆仪、-20 °C冰箱、可调移液器（2 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L）。
3. 耗材：荧光 PCR 反应管、吸头（10 μ L、200 μ L、1000 μ 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。
 - 本试剂盒无法区分流行毒株和基因缺失型毒株。

【样品采集】

组织样品：按规范取肺脏、淋巴结、脾脏等样品约 $3\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ 大小，扁桃体整体采集。
 液体样品：按规范取肺灌洗液 5-10 mL、精液样品 5-10 mL、无菌血清样品 5 mL、口腔拭子保存液样品 3 mL。
 细胞培养物样品：反复冻融 3 次后第 3 次解冻后保存备用。

【样品处理】

组织样品：取适量样品放入装有 2 mL 生理盐水的研磨管中，使用研磨仪等充分研磨，制成组织匀浆液， $6000 \times g$ 离心 5 min，取上清液 200 μL 进行核酸提取。
 肺泡灌洗液： $1500 \times g$ 离心 5 min，取上清液 200 μL 进行核酸提取。
 血清、精液、口腔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。
 细胞培养物： $1500 \times g$ 4°C 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
无菌无核酸酶水	$7 \times (N+1) \mu\text{L}$
反转录酶混合液	$1 \times (N+1) \mu\text{L}$
PCR 反应液	$8 \times (N+1) \mu\text{L}$
引物、荧光探针混合液	$2 \times (N+1) \mu\text{L}$

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 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：反转录 50°C 5 min，预变性 95°C 2 min，循环 95°C 10 s， 60°C 35 s，共 40 次，每次循环的第二步 (60°C 35 s) 收集荧光信号（报告基团“ROX”，淬灭基团“None”）。防污染体系在反转录步骤 (50°C 5 min) 之前加入 UNG 酶消化步骤 25°C 5 min。

【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

阳性对照猪蓝耳病毒结构蛋白基因的 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。试验无效时应重新进行试验。

3. 结果描述及判定

猪蓝耳病毒基因 (ROX 通道) 被检样品 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为猪蓝耳



源微生物

病毒基因阳性，样品中存在猪蓝耳病毒核酸；无 Ct 值且无特异的扩增曲线，猪蓝耳病毒基因阴性，样品中不存在猪蓝耳病毒核酸； $35 \leq Ct < 40$ 并出现特异的扩增曲线，判为猪蓝耳病毒基因疑似，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。

【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。