

非洲猪瘟流行病毒实时荧光 PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

本试剂盒采用探针法双重实时荧光 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，适用于非洲猪瘟病毒的检测。AD-001-0 为普通探针法；AD-001-1 为防污染体系，添加 dUTP 和 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 DNA 作为模板，根据非洲猪瘟 DNA 上的 P72 蛋白基因的特异片段设计引物及 FAM 探针，同时在猪内源特异片段基因上设计引物及 HEX 探针作为内质控，在同一反应管内进行目的基因和内质控的双重检测，判定是否感染非洲猪瘟病毒。

【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℃
阳性对照	20 µL	
PCR 反应液	900 µL	
非洲猪瘟引物、探针、内质控混合液*	900 µL	
说明书	1 份	

*内质控混合液中包括其引物、探针。

【需要自备的器材】

- **试剂：**核酸提取试剂。
- **仪器：**离心机、双/四通道荧光 PCR 扩增仪、匀浆仪、-20℃冰箱、可调移液器（2µL、20µL、200µL、1000µL）。
- **耗材：**荧光 PCR 反应管、吸头（10µL、200µL、1000µL）。

【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 15s，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℃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猪和基因缺失型毒猪。

【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
PCR 反应液	8× (N+1) μL
非洲猪瘟引物、探针、内质控混合液	8× (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 16 μL。

分别取 4 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 5 s，60 °C 30 s，共 45 次，每次循环的第二步（60 °C 30 s）收集荧光信号。（报告基团“非洲猪瘟基因-FAM、内质控-HEX”，淬灭基团“None”使用 ABI 7500 仪器时，由于无 HEX 通道建议用 VIC 通道代替，退火时间设置至少为 31 s）。防污染体系 AD-001-1 在预变性步骤（95 °C 2 min）之前进行消化步骤 50 °C 2 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 P72 基因及内质控基因的 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

FAM 通道和 HEX 通道被检样品 Ct 值 < 35 并出现特异的扩增曲线，判为非洲猪瘟阳性，样品中存在非洲猪瘟病毒核酸。FAM 通道无 Ct 值且无特异的扩增曲线，HEX 通道

Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为非洲猪瘟阴性，样品中不存在非洲猪瘟病毒核酸；
FAM 通道 $35 \leq \text{Ct 值} < 40$ 并出现特异的扩增曲线，HEX 通道 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为非洲猪瘟疑似，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	
	FAM	HEX
ASFV 流行毒株阳性	+	+/-
ASFV 流行毒株阴性	-	+
阳性质控失效或漏加	-	+
试剂失效或者体系配制错误等	-	-

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℃ 以下保存，有效期为 12 个月。