

非洲猪瘟病毒荧光 PCR 检测试剂盒操作规程

1 用法

1.1 样品处理

采用 DNA 提取试剂盒或自动核酸提取仪提取各类样品中的待检 DNA，低温保存。

1.2 扩增试剂准备

1.2.1 将引物探针（棕色管）和酶反应液瞬时离心后，将酶反应液全部移至引物探针（棕色管）中，颠倒混匀 6 次，充分混匀，配制成 PCR 反应液。

1.2.2 根据检测样品数量每个 PCR 反应管加入 18 μl PCR 反应液；先取 2 μl 阴性对照、再取 2 μl 待检 DNA、最后取 2 μl 阳性对照（充分混匀）分别加到不同的 PCR 反应管中，加样结束后应盖紧 PCR 反应管，每个 PCR 反应管内液体的体积为 20 μl 。

1.3 荧光 PCR 反应 加样后将 PCR 反应管瞬时离心，然后置于荧光 PCR 仪内，进行如下反应：

1) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 分钟；2) 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 分钟；3) 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 秒，58 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 1 分钟，45 个循环，在每一循环的 58 $^{\circ}\text{C}$ 时收集 FAM 荧光信号。

2 判定

2.1 结果的有效性 阳性对照的 Ct 值应 <35 且出现特异性扩增曲线，阴性对照应无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 40 且无特异性扩增曲线，试验结果有效；否则应重新进行试验。

2.2 结果判定 被检样品 Ct 值 ≤ 38 且出现特异性扩增曲线，判为阳性；当无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 40 ，判为阴性；当 $38 < \text{Ct 值} < 40$ 且出现特异性扩增曲线，判为疑似。对疑似样品，进行复检 2 次，有 1 次出现 Ct 值 < 40 且出现特异性扩增曲线即判为阳性，否则判为阴性。

3 注意

3.1 使用 ABI 系列荧光定量 PCR 仪时将仪器参数“Passive Reference”设置为“None”。

3.2 阳性对照可直接使用，无需提取。