

## 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

1.1.1 全血、血清、血浆直接进行下一步试验。淋巴结、脾脏、肾脏、扁桃体、肌肉等组织样品取 0.1~0.2g，置研钵充分研磨，加入 10 倍体积分约 1~2ml 生理盐水，混匀；或置研磨管中，加入 10 倍体积分约 1~2ml 生理盐水及研磨珠，用组织研磨仪匀浆。以 5000 转/分钟离心 5 分钟，留上清，即为组织匀浆液。

1.1.2 取 1.5ml 离心管加入 100 $\mu$ l 缓冲液 B1，每管分别加入 10 $\mu$ l 全血（EDTA 抗凝剂）或 20 $\mu$ l 组织匀浆液、血清、血浆样品、阳性对照和阴性对照混匀。室温 3 分钟内涡旋混匀 3~5 次。

1.1.3 每管加入 100 $\mu$ l 缓冲液 B2，涡旋混匀，12000 转/分钟离心 1 分钟，上清为待检核酸。

#### 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 $\mu$ l PCR 反应液；先取 2  $\mu$ l 阴性对照、再取 2  $\mu$ l 待检 DNA、最后取 2  $\mu$ l 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  $\mu$ l。

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 $^{\circ}$ C 孵育 2 分钟；2) 95 $^{\circ}$ C 预变性 20 秒；3) 95 $^{\circ}$ C 变性 10 秒，58 $^{\circ}$ C 延伸 20 秒，共 40 个循环；设置 58 $^{\circ}$ C 收集 FAM 荧光信号。

### 2 判定

2.1 结果的有效性 阳性对照应出现特异性扩增曲线且 Ct 值 $<$ 35，且阴性对照无特异性扩增曲线或无 Ct 值，则试验成立；否则试验不成立。

2.2 结果判定 样品 Ct 值 $\leq$ 37 且出现特异性扩增曲线，判为阳性；无 Ct 值且无特异性扩增曲线，判为阴性；当 37 $<$ Ct 值 $<$ 40 时判为可疑，应重新提取样品核酸进行检测，若 Ct 值仍 $<$ 40，则判为阳性，若无 Ct 值且无特异性扩增曲线，判为阴性。

### 3 注意

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

3.2 阳性对照可直接使用，无需提取。