

## 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 20  $\mu\text{l}$  PCR 反应液；先取 5  $\mu\text{l}$  阴性对照、再取 5  $\mu\text{l}$  待检 DNA、最后取 5  $\mu\text{l}$  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 25  $\mu\text{l}$ 。

1.3 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 20 秒；3) 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 10 秒，60 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 秒，共 40 个循环；设置 60 $^{\circ}\text{C}$  收集 FAM 和 VIC/HEX 荧光信号。

### 2 判定

#### 2.1 结果的有效性

2.1.1 单次试验的有效性 每次检测试验的阳性对照 FAM 和 VIC/HEX 通道均应出现特异性扩增曲线且 Ct 值  $<35$ ，阴性对照 FAM 和 VIC/HEX 通道均无特异性扩增曲线或无 Ct 值，则试验成立，否则试验不成立。

2.1.2 单管反应的有效性 每个样品反应管的 VIC/HEX 通道 Ct 值  $\leq 37$  则该反应污染，该反应管检测不成立；当  $37 < \text{Ct 值} < 40$  时，可能存在污染；Ct 值  $\geq 40$  或无特异性扩增曲线则该反应管检测成立。

2.2 结果判定 应结合 FAM 通道和 VIC/HEX 通道进行判定：在单次试验有效的前提下，单管反应有效时，FAM 通道 Ct 值  $< 40$ ，则判为阳性；FAM 通道 Ct 值  $\geq 40$  或无特异性扩增曲线，则判为阴性。当单管反应可能存在污染时，FAM 通道 Ct 值  $\leq 35$ ，则判为阳性。其他情况均为可疑，需重新采样进行检测，两次可疑判为阳性；详见下表。

通道	Ct 值	FAM		
		$\leq 35$	$< 40$	$\geq 40$ 或无
	$\leq 37$	污染	污染	污染
VIC/HEX	$37 < \text{Ct 值} < 40$	阳性	可疑	可疑
	Ct 值 $\geq 40$ 或无	阳性	阳性	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。