猪伪狂犬病毒荧光 PCR 检测试剂盒（实时荧光 PCR 法）

使用说明书

【产品名称】

通用名称：猪伪狂犬病毒荧光 PCR 检测试剂盒（实时荧光 PCR 法）

英文名称：Porcine Pseudorabies virus Detection Kit (Real-Time PCR Method)

【包装规格】 50T/盒

【预期用途】

猪伪狂犬病毒（Porcine Pseudorabies virus，PPrV）在分类学上属疱疹病毒科猪疱疹病毒属。本试剂盒利用实时荧光 PCR 原理，定性检测 PPrV，对 PPrV 引起的猪的疫病的诊断和监控具有重要指导意义。

【原　　理】

本试剂盒针对 PPrV 高度保守区域设计特异性引物和探针，在反应体系中含 PPrV 基因组模板的情况下，PCR 反应得以进行并释放荧光信号。利用仪器对 PCR 过程中相应通道的信号强度进行实时监测和输出，实现检测结果的定性分析。

【试剂盒组成】

序号	组成	50T/盒
1	PPrV　PCR 反应液	1000 μL×1 管
2	PPrV 阳性对照	40 μL×1 管
3	PPrV 阴性对照	40 μL×1 管
4	说明书	1 份

注：阴性对照为灭菌纯水，阳性对照为含猪伪狂犬靶基因的质粒。

【储存条件及有效期】避光-20℃以下保存，避免反复冻融，有效期 12 个月。

【适用仪器】ABI 系列、Bio-Rad 系列、Agilent Stratagene MX 系列、Roche LightCycler R480、Cepheid SmartCycler、Rotor-Gene 系列、杭州博日系列等多通道实时荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1. 新鲜采集的咽拭子、鼻拭子标本，并使用灭菌生理盐水悬浮。
2. 患病动物的脑、心、肝、脾、肺、肾、扁桃体等病理组织。
3. 标本收集后若不能立即检测，可置于 2～8℃冷藏过夜保存；如需长期保存，标本应冻存于-20℃～-80℃。
4. 标本保存期间应避免反复冻融。

【检验方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）

（1）从冰箱中取出试剂盒，从试剂盒中取出实验所需试剂，充分融化混匀并瞬时离心以去除管壁附着液体。

（2）核算当次实验所需要的反应数（n），并根据如下表所示反应体系计算当次实验所需要的各种试剂量。

n =阴性对照数（1T）+阳性对照数（1T）+误差预留量（1T）+样本数

单反液配制表(每份)	PCR 反应液（UNG 酶及 Taq 酶）	20μL

（3）在无菌离心管中加入上述试剂，充分混匀后瞬时离心。按照 20 μL/管分装量将试剂分装至 PCR 反应管。

（4）盖紧 PCR 反应管盖后将 PCR 反应管转移至样本处理区。剩余试剂放回-20℃以下冰箱冷冻保存。

2.样本准备（样本处理区）

用 QIAGEN、Roche 公司 DNA 提取试剂盒提取 DNA，具体操作按照其试剂盒说明书操作。

3.加样

在上述制备好的 PCR 反应样本管中分别加入处理好的待测标本 DNA 各 5μl、终体积 25μl/管，盖好 PCR 反应盖混匀后瞬时低速离心，转移到 PCR 仪器上。阴性对照和阳性对照管则各加 5μL 试剂盒自带的阴性对照或阳性对照品，终体积为 25μl/管，盖好 PCR 反应盖混匀后瞬时低速离心，转移到 PCR 仪器上。

4.PCR（PCR 扩增区）

（1）取样本处理区准备好的 PCR 反应管，放置在实时荧光定量 PCR 仪样品槽相应位置，并记录放置顺序。

反应体积	25 μL	通道选择	FAM 通道采集 PPrV 荧光信号
PCR 反应条件	步骤	条件	循环数
	UNG 处理	37℃：2 分钟（min）	1
	预变性	95℃：3 分钟（min）	1
	PCR 扩增	95℃：5 秒（s）	40
		55℃：40 秒（s） （此阶段结束时采集荧光信号）	

（2）按下表设置仪器核酸扩增相关参数进行 PCR 扩增。

注：ABI 系列荧光 PCR 仪在设置时不选 ROX 校正，设置淬灭基团选择 None。

【参考值（参考范围）】

1.试剂盒有效性判定：

（1）阳性对照：有典型 S 型扩增曲线或 Ct 值≤35。

（2）阴性对照：Ct 值＞38 或无 Ct 值，线形为直线或轻微斜线，无指数增长期。

2.标本结果判定：

（1）阳性：标本检测结果 Ct 值≤35 或有明显指数增长期。

（2）可疑：标本检测结果 Ct 值在 35～38 范围内。此时应对标本进行重复检测，如重复实验结果 Ct 值仍在 35～38 范围内，有明显指数增长期，则判定为阳性，否则为阴性。

（3）阴性：标本检测结果 Ct 值＞38 或无 Ct 值。

【检验结果的解释】

通道及检测结果	标本检测结果解释
FAM	
+	标本中检出 PPrV
-	标本中未检出 PPrV

【检验方法的局限性】

1. 当检测样本中被检核酸浓度低于本试剂盒的最低检出限时可能会发生假阴性的结果。
2. 被检样本在采集、运输、储存以及处理过程中操作方式不当容易造成 RNA 降解而产生假阴性结果。
3. 样本在采集、运输、储存以及处理过程中发生交叉污染，则容易得到假阳性结果。

【产品性能指标】 产品的最低检出限为 10^3Copies/mL，产品 CV 值≤3%。

【注意事项】

1. 使用本试剂盒的实验室，应严格按照国家有关部分颁布的有关基因扩增检验实验室管理规范进行管理；
2. 为避免 RNA 降解，样本处理过程应在 0-4℃条件下操作，且完成实验后立即上机检测；样本处理过程中使用的器具耗材应经过无核酶处理；
3. 各区域物品均为专用，不得交叉使用，以免污染；检测结束后，应立即对工作台清洁；
4. 吸取反应液时，应尽量避免产生气泡；上 PCR 仪前，应注意检查各反应管是否盖紧，以免液体蒸发造成结果不准确；
5. 试剂盒所有试剂在使用前应该在常温下充分融化混匀，并应瞬时离心；
6. 试剂盒内所配阴性和阳性对照在第一次使用前应全部转移至标本准备区，并单独存放；
7. 为防止荧光干扰，应避免裸手直接接触 PCR 反应管，并应避免在 PCR 反应管上进行任何标记；
8. 检测过程中使用过的吸头，应直接打到盛有 10%次氯酸的废物缸内，检测结束的 PCR 反应管，切忌开盖，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃；工作台及各种实验用品应定期用 10%次氯酸、75%酒精或紫外灯进行消毒；
9. 仪器扩增相关参数应按照本说明书相关要求进行设置；不同批号试剂不能混用；并在有效期内使用。