猪蓝耳病毒直接扩增 RT-qPCR 抗原检测试剂盒说明书

[中文名称] 猪蓝耳病毒直接扩增 RT-qPCR 抗原检测试剂盒

[包装规格]50 头份/盒

[预期用途] 本试剂盒反应 buffer 及酶抗干扰优势明显，因此可免于传统的核酸提取纯化。适用于对肺、扁桃体、脑等组织及血清等样本中的猪蓝耳病毒 RNA 进行检测。

[主要组成成分]

	序号	名称	规格
A 部分	1	直扩 RT-qPCR 反应液	1140 μl×2
	2	直扩 RT-qPCR 酶混合液	110 μl
	3	猪蓝耳直扩 RT-qPCR 引物探针	300 μl
	4	猪蓝耳直扩 RT-qPCR 阳性对照	100 μl
	5	直扩 RT-qPCR 阴性对照	1000 μl
B 部分	6	裂解液 B1	30 ml
	7	裂解液 B2	30 ml

[储存条件及有效期] A 部分试剂储存于(-30～-15)℃，≤0℃运输，B 部分试剂储存于(2~8)℃即可，有效期为 12 个月。

[适用仪器] ABI7500、罗氏 96/480、安捷伦、伯乐、国产博日、宏石等各种荧光定量 PCR 仪。

[样本要求]

1. 适用样本类型：肺、扁桃体、脑等组织及血清等含病毒 RNA 的样本。
2. 样本的采集：采集肺、扁桃体、脑等样本放入无菌离心管密闭送检。
3. 样本保存：新鲜采集样本应在 4℃条件下 48 小时或-20℃保存 3 个月，长期保存应置于-70℃以下保存。应避免反复冻融。

[操作步骤]

1. 粗提步骤

1.1 固体类样本：

a) 向 1.5 ml EP 管中加入 5-10mg 组织样本（大小约与半个绿豆相当），然后加入 100 μl 裂解液 B1，并用组织研磨器充分研磨。

b) 研磨结束后，继续向研磨液中加入 100 μl 裂解液 B2，涡旋混匀。

c) 混匀后，将提取物于常温下 12000rpm 离心 2min，取 100-150μl 上清于干净的 EP 管中。此上清液作为模板即可进行后续的 qPCR 检测，**必须现处理现用**。

1.2 液体类样本：

a) 液体类样品（血液除外）可以用来直接进行 PCR 反应，不需要前期处理。

b) 血液类样本： 取 40μl 血液加入到 100 μl 裂解液 B1 中，混匀后室温静置 5min 加入 100 μl 裂解液 B2，再涡旋混匀。12,000 rpm 离心 2 min,取上清作为模板，进行后续的 qPCR 检测，**必须现处理现用**。

备注：

a) 若使用组织捣碎机处理，则取组织样本加入 500 μl 裂解液 B1，捣碎后再加入 500 μl 裂解液 B2，混匀离心取上清。

b) 本试剂盒的阴、阳性对照均不需提取，直接作为模板即可。

2. 扩增试剂配制

试剂组分	1个反应加入量
直扩RT-qPCR反应液	38 μl
直扩RT-qPCR酶混合液	2 μl
猪蓝耳直扩RT-qPCR引物探针	5 μl
模板	5μl
总量	50μl

设阴、阳性对照，加完样品后再瞬时离心，上机检测。

仅供科研

3. 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
1	50 ℃	10 min	1 cycle
2	95 ℃	3 min	1 cycle
3	95℃	10 sec	5 cycles
	62℃	30 sec	
	72℃	30 sec	
3	95 ℃	10 sec	40 cycles
	58℃（此步收集荧光）	30sec	

仪器检测通道选择：选择 FAM 通道（Reporter：FAM）检测；具体检测通道设置可参照各仪器使用说明。

[检测结果的质量标准及判定]

分析条件设置：阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。

如果阳性对照扩增曲线有明显对数扩增曲线，且 Ct 值≤30，阴性对照扩增曲线无 Ct 值显示，二者均成立才可判定试验成立，否则试验无效。

1) 如果检测样本 Ct 值≤30，报告为猪蓝耳病毒核酸阳性。
2) 如果检测样本 30＜Ct 值≤35 时为可疑，需重新对样本裂解处理进行检测，如仍为可疑，则判为阳性；若重复检测 Ct 值＞35，则判为阴性。
3) 如果检测样本的 Ct 值＞35 或者无数值，则判为阴性。

[注意事项]

（1）开始检测前请仔细阅读本说明书，按要求操作。

（2）组织样品的前期处理和核酸扩增应注意生物安全。

（3）试剂盒 A 部分试剂使用前，应充分融化均匀后混匀，瞬时离心。

（4）加样时应使样品完全落入反应液中，不应有样品黏附于管壁上，加样后应尽快压紧管盖。

（5）核酸反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各荧光定量 PCR 反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。

（6）PCR 体系配制与分装等操作应在冰上进行。

（7）经样品裂解液处理过的样本，不能用于样本保存，仅用于即时检测。

（8）研磨时不可使用金属转头，以保证结果的准确性。

（9）研磨组织样本不宜过大，以防杂质含量太高而抑制后续的 PCR 反应。

仅供科研