

试剂盒组分:

规格	100T
Lyophilized TaqMan PCR Reagent	1 瓶
2×TaqMan PCR Buffer5	1 ml
ASFV TaqMan PCR Assay	1 支
阳性标准品 (10 ⁵ copy /μl) 干粉	1 支

试剂盒性能说明:

(1) 靶标基因及探针: 针对非洲猪瘟 P72 外膜蛋白。探针携带 FAM 荧光标记基团。

(2) 试剂盒灵敏度及阳性判断: 该试剂盒的灵敏度为 5 copy。通常阳性标准质粒的 Ct 值在 21~25 左右。水对照和阴性猪 DNA 样品测试实验中, 在 35 个循环条件下未见有明显扩增曲线。

使用方法:

1. TaqMan PCR Reagent 为冻干品形式, 内含热启动 Fast Taq DNA 聚合酶、dNTP 等, 在未溶解前, 该制品可-20°C 长期保存, 并可室温运输, 性能无下降。使用前每瓶用 1ml 的 2×TaqMan PCR Buffer5 溶解后, 可立即使用, 剩余试剂可在-20°C 保存 1 个月, 在-60°C 以下长期保存。

2. ASFV TaqMan PCR Assay 为干粉形式(含引物和探针), 该制品可-20°C 长期保存, 并可室温运输, 性能无下降。使用前每瓶用 750 μl 的 ddH₂O 溶解后, 可立即使用, 剩余试剂可在-20°C 保存 1 个月, 在-60°C 以下长期保存。

3. 阳性标准品为干粉形式, 首次使用前加入 100 μl 的 ddH₂O, 漩涡 10s 溶解后, 保存于-20°C。溶解后的制品浓度为 10⁵ copy /μl, 每次实验时采用 2.5μl 即可。

4. 按照如下组分配制 PCR 反应体系:

溶解后的 TaqMan PCR Reagent 10 μl

溶解后的 ASFV TaqMan PCR Assay 7.5 μl

提取的核酸 DNA 样品 2.5 μl

5. 进行 Real-Time PCR 扩增 (FAM 信号), 程序如下:

Stage 1: 95°C: 30 s

Stage 2: 95°C: 5 s

60°C: 20 s 35 循环

6. 结果判读

6.1 实验成立条件

(1) 阳性标准品的扩增 Ct<25

(2) 阴性水对照的扩增无 Ct

6.2 判定标准

(1) 阳性: 检测样品扩增曲线明显, 表明样品中含有病毒分子。

(2) 阴性: 检测样品无 Ct (平线), 表明样品中不含有病毒分子。