

技术原理:

本试剂盒采用多重恒温探针环扩增技术,配合特异性的双标荧光探针进行非洲猪瘟病毒(ASFV)检测。试剂盒采用单管两重设计,靶标基因 P72 和猪内参 beta-actin 基因。

技术指标:

1. 中进行两重 LAMP 扩增,分别靶向 P72 (FAM) 和内参 beta-actin (ROX) 用于扩增和采样质控。
2. 使用拭子浸泡液的情况下(不进行核酸提取),有效灵敏度: 200 个病毒/拭子。在 P72 质粒标准品测试中,灵敏度均为单 copy。猪 gDNA 可检测到 0.1ng。
3. 酸纯化步骤,可以直接使用拭子浸泡液。在 25 μ l 的 LAMP 反应体系中,可采用 5 μ l 的拭子浸泡液。
4. 度快,恒温 65℃ 条件下,30min 内完成检测。在每个检测管中含有 100 个病毒以上的样本,10min 内完成检测。
5. 异性的双标荧光探针,准确性 100%,无假阳性。

6.P72 基因靶标序列如下:

```
TTTGTGCCGGGTACAATGGGTCTTCCAAAAGGATCTACAAGCGTGTAACGGCGCCC  
TCTAAgGGTGTGGTTGTCCAGTCATATCCGTTGCGAGGAAACGTTTGAAGCTGCC  
CATGGGCCCCATCTGGGACGTGCCCTGAATCGGAGCATCTGCCAGGAIGAATGAC  
ATGCACCCAATATATGATGGCCACCATATCATGGAAAAAGTCTCCGTA CTGGGAATA  
CCAAAGGTAAGCTTGTTCCTCAAGGTGGGGGTACCCGTATGCGGGCGTACTTTA
```

组分

名称	50 次
P72 2IsoAmp Solution A	0.5 ml
P72 2IsoAmp Solution B	0.5 ml
P72 阳性标准品	20 μ l
IsoAmp 快速核酸释放剂	20 ml

保存条件:

- (1) 试剂盒整体保存于-20℃,1年内有效
- (2) P72 阳性标准品为 DNA 形式,浓度为 100 copy/ μ l。每次阳性对照使用 5 μ l。
- (3) 不同批次的试剂组分,不要混用。

检测样本的使用说明:

1. 鼻腔拭子采集完毕后,将拭子棉签部分放入到含有 0.3ml 本试剂盒提供的 IsoAmp 快速核酸释放剂中,可在 1.5 ml EP 管,或 2 ml 病毒保存管中操作。在释放剂覆盖棉签的情况下,漩涡混合 10-20s,使棉签上的病毒和猪体细胞从棉签上脱落。放置到 75℃ 以上温度下(可用开水),加热 5 分钟。取 5 μ l 加热后的浸泡液即可用于后续检测。
2. 样本:采血完毕后(不要加入抗凝剂),待血液凝固,取 50 μ l 血清到 50 μ l IsoAmp 快速核酸释放剂中,混合均匀。放置到 75℃ 以上温度下(可用开水),加热 5 分钟。取 5 μ l 用于后续检测。(注意:不要使用抗凝剂处理的血浆样品,血浆样品中高浓度抗凝剂会抑制检测反应)。
3. 试剂盒可同样适用于纯化的核酸样本,取 5 μ l 核酸样品即可用于检测。

使用方法:

1. 仪器和程序设置
2. 恒温扩增的检测可以使用标准定量 PCR 仪 (也可使用恒温荧光设备), 荧光通道选择 FAM 和 ROX 双通道。
3. 步骤 1: 65℃ 10s
4. 步骤 2: 65℃ 50s 收集信号, 循环 30 次, 即总反应时间为 30min。
5. 注意: 本试剂盒无需热盖加热, 在使用定量 PCR 进行检测时, 可关掉 PCR 仪的热盖功能, 以缩短检测时间。
6. 2. 配置反应体系
7. 2.1 向检测反应管中加入 10 μl 的 P72 2IsoAmp Solution A、10 μl 的 P72 2IsoAmp Solution B。
8. 2.2 向检测反应管中加入 5 μl 的待检测病毒液[或 P72 阳性标准品(阳性对照), 或 IsoAmp 快速核酸释放剂(阴性对照)]。
9. 2.3 反应体系配好后, 混匀 2-5s。并短暂离心, 置于荧光定量 PCR 仪上进行反应即可。
3. 结果判读
- 3.1 结果判读的成立条件:

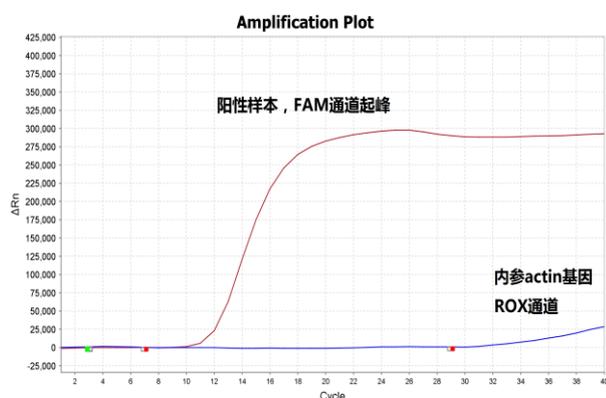
	FAM 通道 (非洲猪瘟)	ROX 通道 (beta-actin 内参)	结果
P72 阳性标准品	起峰, 成典型扩增曲线		可靠
阴性对照	无信号	无信号	
P72 阳性标准品	无信号		试剂失效, 重新检测
阴性对照	起峰, 成典型扩增曲线		发生污染, 重新检测

3.2 检测样本结果判读:

FAM 通道 (非洲猪瘟)	ROX 通道 (beta-actin 内参)	判读结果
起峰, 成典型扩增曲线		阳性
无信号	起峰	阴性
无信号	无信号	采样不佳或样本保存失, 重新采样和检测。

3.3 典型的检测结果

阳性样本(10 copies)
红色线为 FAM 信号, 表明存在非洲猪瘟核酸分子



阴性样本 (5 μl 拭子浸泡液)
FAM 无信号, ROX 有信号, 表明不含非洲猪瘟核酸分子

