

超敏双重非洲猪瘟巢式荧光 PCR 检测试剂盒

(TaqMan One-Step Nested PCR 法)

货号: A227018 规格: 100 头份 × 25μl 保存: -20°C



组分:

名称	100T
2.5xOne-Step Nested PCR Buffer Mix	1 ml
SD 2.0 DNA Polymerase (1.25U/ul)	100 μl
Nested ASFV Oligo Mix	900 μl
阳性标准品 (10e4 copy /μl)	100 μl

保存条件: 试剂保存到-20°C以下, 可保存 12 个月。

试剂盒性能说明:

- 靶标基因及探针: 针对非洲猪瘟 P72 外膜蛋白。探针携带 FAM 荧光标记基因。
- 内参基因及探针: 针对猪 GAPDH 基因。探针携带 ROX 荧光标记基因。
- 试剂盒灵敏度及阳性判断: 该试剂盒的灵敏度为单 copy。通常阳性标准质粒的 Ct 值在 18~24 左右。水对照和阴性猪 DNA 样品测试实验中, 在 40 个循环条件下未见有明显扩增曲线。内参 GAPDH 基因可检测到 0.04ng 猪基因组 DNA。

使用方法:

- 按照如下组分配制 PCR 反应体系:
每次检测反应, 做阴性对照一孔 (5 μl ddH₂O), 做阳性对照一孔 (5 μl 阳性标准品)。

2.5xOne-Step Nested PCR Buffer Mix	10 μl
Nested ASFV Oligo Mix	9 μl
*SD 2.0 DNA Polymerase	1 μl
检测核酸模板	5 μl
总体积	25 μl

注意: SD 2.0 DNA Polymerase 含有高浓度的甘油, 比较粘稠, 请小心吸取。

- 在定量 PCR 上设置 FAM 和 ROX 通道收集信号

*90°C	5 min	
*90°C	10 s	循环 40 次
60°C	30 s(收集信号)	

注意: SD 酶的变性温度为 90°C, 其它温度条件都会导致试剂性能下降。请反复核实, 该参数是否设置正确。

3. 结果判读

3.1 实验成立的条件

(1) 阳性标准品 FAM 通道扩增正常, 通常 Ct=24-28. 阴性 ddH₂O 不起峰。在此条件下待检测其它样品判读有效。

(2) 阳性标准品 FAM 通道不起峰, 表明 PCR 程序设置错误, 或试剂失效, 需重新检测。

(3) 阴性 ddH₂O FAM 通道起峰, 表明发生污染, 需重新检测。

3.2 待检样本判读

FAM (P72 基因)	ROX (猪内参)	结果判读
Ct<32	不参考	阳性
Ct=32-40	不参考	复检一次, 仍然在此区间, 判读为阳性, 否则判读为阴性。通常此区间表明猪瘟病毒<5copy。
无 Ct	有信号	阴性
无 Ct	无 Ct	(1) 检测样本来自其它材料的情况下, 比如饲料、外包装、器皿、器械, 则判读为阴性。 (2) 检测样本来源于猪材料, 则可能存在投入反应体系的核酸量太少, 导致假阴性, 此时可考虑增加投入反应体系核酸量进行复检。复检仍然为阴性的, 判读为阴性。本试剂最低猪基因组 DNA 的检出量为 0.04ng。

关于检测模板的特殊说明:

(1) 血清、血浆、全血样本对反应抑制较严重, 不建议直接使用。需要使用柱式或核酸自动提取仪提取的核酸样本。

(2) 鼻拭子、口腔拭子、肛拭子等拭子类样本, 可以用少量 (0.3-2ml) ddH₂O 浸泡, 漩涡 10s 后, 直接取 5μl 浸泡液作为模板进行检测反应。在测试中, 拭子样本直接使用情况下优于核酸纯化的样本。因此建议拭子样本类采用直接检测的方法。同时也建议尽可能采取拭子样本, 作为非洲猪瘟检测的主要样本类型, 以加快检测速度和降低核酸纯化的成本。