

描述： 鸽新城疫是由鸽源禽 I 型副黏病毒((Pigeon Paramyxovirus, PPMV))引起的一种高度接触性、败血性传染病。该病发病急、传播快、死亡率高，因此早期快速的诊断对该病疫情的控制有重要意义。PPMV I 为单股负链 RNA 病毒，全基因组长度约为 15kB，编码 6 种主要的结构蛋白，其中 F 蛋白和 HN 蛋白为主要的免疫原性蛋白。本试剂盒的靶标蛋白为 F 蛋白，采用 LAMP TaqMan 技术进行检测。可以鸽肉、血清、全血、排泄物、口腔拭子等作为样本，制备 RNA 作为检测模板进行检测，该试剂盒检测灵敏度可达 5 copy。

组分

名称	50 次
LAMP TaqMan Reagent	1 瓶
LAMP Buffer	0.75 ml
PPMV LAMP TaqMan Assay	1 支
PPMV 阳性标准品 (10 ⁵ Copy/μl)	1 支

使用方法：

1. LAMP TaqMan Reagent 为干粉形式，包含 Bst 5.0 DNA 聚合酶、dNTP 等，在未溶解前，该制品可-20℃长期保存，并可室温运输，性能无下降。使用前每瓶用 0.75 ml 的 LAMP Buffer 溶解后，可立即使用，剩余试剂可在-20℃保存 1 个月，在-60℃以下长期保存。

2. PPMV LAMP TaqMan Assay 为干粉形式，该制品可-20℃长期保存，并可室温运输，性能无下降。使用前每瓶用 125μl 的 ddH₂O 溶解后，可立即使用，剩余试剂可在-20℃保存 1 个月，在-60℃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℃。溶解后的制品浓度为 10⁵ copy /μl，每次实验时采用 1 μl 即可。

4. 仪器和程序设置

LAMP TaqMan 的检测可以使用标准定量 PCR 仪（也可使用恒温荧光设备），探针报告基团为 FAM。

使用定量 PCR 仪进行 LAMP TaqMan 扩增程序如下：

步骤 1: 60℃ 10s

步骤 2: 60℃ 50s 收集信号，循环 25 次

总反应时间为 25min。

5. 配置反应体系

溶解后的 LAMP TaqMan Reagent	15 μl
溶解后的 PPMV LAMP TaqMan Assay	2.5 μl
检测模板 RNA	2.5 μl

反应体系配好后，充分混匀并短暂离心，置于荧光定量 PCR 仪上进行反应即可。

注意： LAMP 反应高度敏感，反应结束后，务必不要打开管盖，以防止气溶胶污染。一旦发生气溶胶污染，请使用 HaiGene 的 DNA 气溶胶污染去除剂 (A6001) 进行环境清理。

6. 结果判读

6.1 结果判读成立条件

阴性水对照不起峰、阳性标准品在 10~14 min 起峰条件下，结果判读有效。

6.2 阳性结果判读

有扩增曲线，判定为阳性。在 25min 以后起峰但不明显的情况下，通常 Copy 数小于 2copy。需要进行复核实验，仍然起峰的情况，表明为阳性。否则表明为阴性。

6.3 阴性结果判读

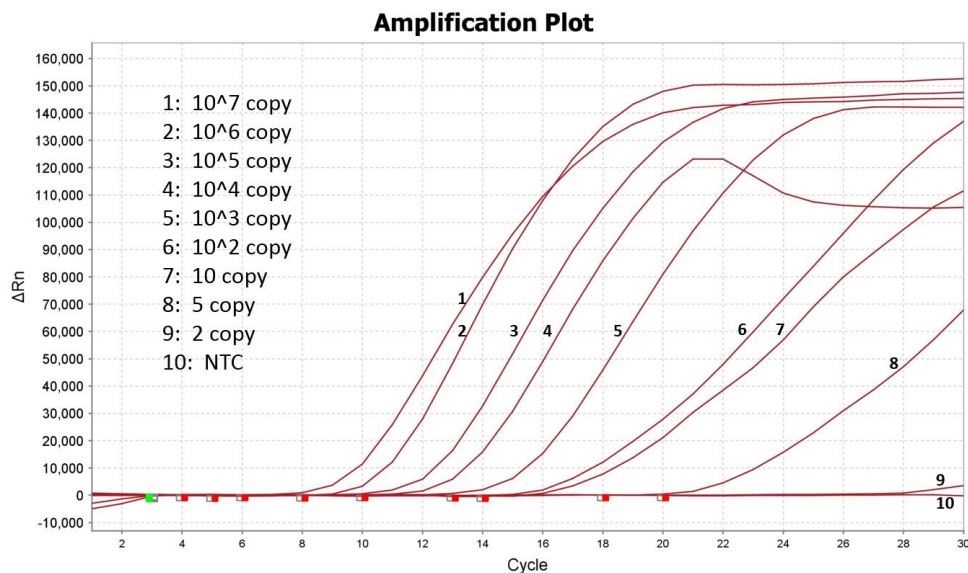
平线表明为阴性样本。

性能测试

1. 灵敏度测试

以标准质粒为模板，进行鸽新城疫病毒检测试剂盒 LAMP TaqMan 灵敏度检测

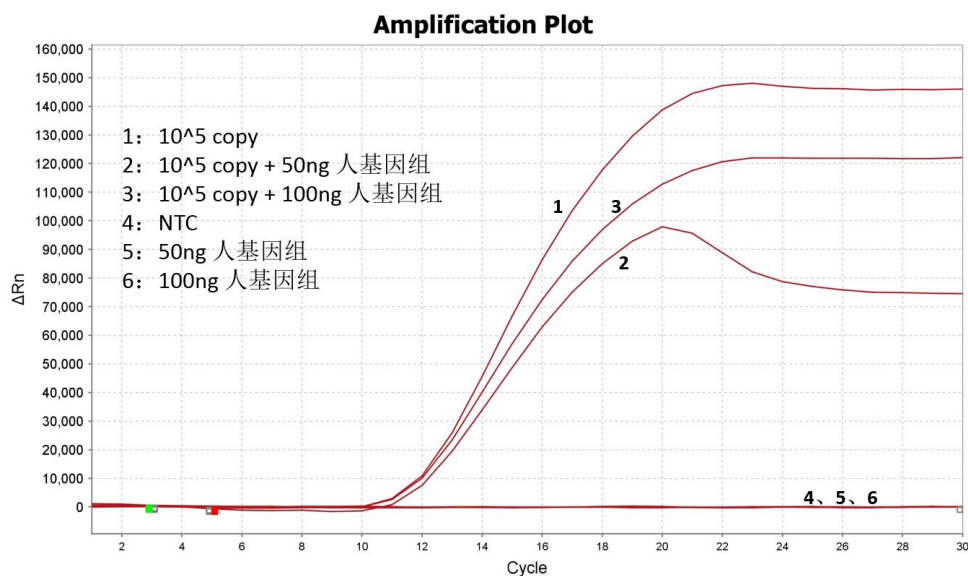
1-10: 模板浓度为 10^7 copy~2 copy，均可检测出，且 NTC 平线。该试剂盒灵敏度为~10 copy。



■ Target 1

2. 抗干扰能力测试

1-3: 单管反应中 10^5 copy 标准质粒，并加入 0、50ng、100ng 人基因组作为干扰，结果表明添加基因组后对灵敏度无影响。5-6: 单管反应中无标准质粒，加入 50ng 和 100ng 人基因组，扩增结果无信号，表明鸽新城疫病毒特异性引物与人源基因序列无交叉，引物特异性良好。4: NTC，曲线平滑无扩增，表明引物特异性良好。



■ Target 1