

一、非洲猪瘟现场快速检测实验操作规程

本规程推荐的检测程序、仪器设备和试剂等可作为非洲猪瘟病毒荧光定量 PCR 检测方法的一般性指南，用户可根据实验室需求选择仪器设备型号及耗材，优化最佳的检测程序。

1 样品处理

1.1 试验材料：待检样品为采集的猪全血，非洲猪瘟病毒荧光定量 PCR 快速检测试剂盒（缓冲液 B1 和缓冲液 B2）。

1.2 设备与材料：小型离心机，涡旋振荡器，100 μ l 移液器，吸头，1.5ml 离心管。

1.3 操作步骤

血液混样操作：可将 5 份猪全血进行混样，每份血样取 10 μ l 于离心管后，涡旋振荡混匀，即为混样。

取 10 μ l 单样或混样新鲜抗凝全血加入 100 μ l 的缓冲液 B1 中，室温消化 3 分钟，涡旋混匀 3~5 次。

向上述混合液中加入 100 μ l 的缓冲液 B2（恢复至室温并混匀使用），涡旋混匀，12000 转/分钟离心 1 分钟，上清为 PCR 待检核酸，取 2 μ l PCR 待检核酸进行 PCR 反应。如在 2 小时内检测则 PCR 待检核酸置于 4 $^{\circ}$ C 保存，否则置于 -20 $^{\circ}$ C 以下冰箱保存。

2 PCR 反应

2.1 试验材料：待检样品为 PCR 待检核酸，非洲猪瘟病毒荧光定量 PCR 快速检测试剂盒（PCR 反应液、反应阳性对照和阴性对照）

2.2 设备与材料：荧光定量 PCR 仪，掌式离心机，20 μ l 移液器，10 μ l 移液器，吸头，荧光定量 PCR 反应管，乳胶手套，口罩。

2.3 操作步骤

扩增试剂准备：每个反应的体积为 20 μ l。根据检测样品数量每个反应管加入 18 μ l PCR 反应液。依次取 2 μ l 阴性对照、PCR 待检核酸、反应阳性对照到 PCR 反应管中。

PCR 反应：加样后，将 PCR 管置于荧光定量 PCR 仪内进行如下反应：

1) 95 $^{\circ}$ C 预变性 20 秒；2) 95 $^{\circ}$ C 变性 10 秒，58 $^{\circ}$ C 延伸 20 秒，共 40 个循环；设置 58 $^{\circ}$ C 收集 FAM 荧光信号。

判定 结果的有效性：阳性对照应出现特异性扩增曲线且 Ct 值 < 35，阴性对照无特异性扩增曲线或无 Ct 值。

当样品的扩增结果有典型的扩增曲线且 Ct 值 <40 时可判定为阳性 (强阳性样本的 Ct 值 <30)。当样品的扩增结果无 Ct 值或背景信号之下时，判定为阴性结果。

立见快速荧光定量PCR试剂盒操作简图

