

伪狂犬病毒 gE 基因 (PRV) 荧光 PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for the detection of Pseudorabies Virus

(50 reactions)

1、试剂盒简介

货号: HB-301-1

伪狂犬病是由伪狂犬病病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 引起的猪的急性传染病。该病在猪呈暴发性流行。可引起妊娠母猪流产、死胎, 公猪不育, 新生仔猪大量死亡, 育肥猪呼吸困难、生长停滞等, 是危害全球养猪业的重大传染病之一。伪狂犬病毒属于疱疹病毒科 (Herpesviridae)、alpha 疱疹病毒亚科, 伪狂犬病毒在全世界广泛分布。伪狂犬病自然发生于猪、牛、绵羊、犬和猫, 另外, 多种野生动物、肉食动物也易感。水貂、雪貂因饲喂含伪狂犬病毒的猪下脚料也可引起伪狂犬病的暴发。实验动物中家兔最为敏感, 小鼠、大鼠、豚鼠等也能感染。在猪场, 伪狂犬病毒主要通过已感染猪排毒而传给健康猪, 另外, 被伪狂犬病毒污染的工作人员和器具在传播中起着重要的作用。而空气传播则是伪狂犬病毒扩散的最主要途径。在猪群中, 病毒主要通过鼻分泌物传播, 另外, 乳汁和精液也是可能的传播方式。本试剂盒是依据相关标准中推荐的检测伪狂犬病毒 gE 基因的方法研发生产, 可检出猪伪狂犬的 gE 基因。探针的 5' 端和 3' 端分别标记不同的荧光素, 如 5' 端标记 FAM 荧光素, 3' 端为 BHQ1 修饰。

2、试剂盒组成

试剂盒组成包括核酸扩增试剂。具体组成参见表 1:

表 1: 试剂盒组成 (50test/盒)

试剂盒组成成分	体积
核酸扩增试剂:	
DEPC 水	1ml × 1 管
PRV 荧光 PCR 反应液	750 μL × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40 μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
PRV 荧光阳性对照	1ml × 1 管

(注: 推荐使用提取核酸更快捷方便的《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》)

3、样本采集, 存放及运输

3.1 样本采集: 所用取样器材必须经高压灭菌并烘干。

用于检测多种样本 (如患病动物的分泌物如鼻咽拭子或组织病料中) 中伪狂犬病毒的 DNA。

3.2 存放: 样品应尽快研磨提取核酸进行检测, -70 °C 以下可长期保存, 但应避免反复冻融。

3.3 运输: 采用冰壶或泡沫箱加冰密封进行运输。

4、荧光 PCR 检测

4.1 操作方法

公司地址: 北京市顺义区南法信顺畅大道 14 号院东亚首航国际 1 号楼 3 层 329 室

公司网址: www.halcyonbio.com

邮 箱: haisentong@126.com

电话: 010-50933955, 13718421576, 18610566381

客服 QQ: 737481857 1632557907

4.1.1 样本的处理（在样本制备区进行）：详见核酸提取试剂盒说明书。【推荐使用《《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》》，更方便快捷高效提取核酸】。

4.1.2 检测

4.1.2.1 扩增试剂准备（在反应混合物配制区进行）：

从试剂盒中取出相应的荧光 PCR 反应液、Taq 酶，2000×g 离心 5 秒钟。每个样品测试反应体系配制见下表 2。

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	荧光 PCR 反应液	Taq 酶	合计
用量	14.5 μL	0.5 μL	15 μL

4.1.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个荧光 PCR 管孔中各分装 15 μL 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 10 μL，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。

4.1.2.3 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：

第一阶段，94°C/3 min；

第二阶段，94°C/15 sec，60 °C/30 sec，40个循环，在第二阶段每次循环的退火延伸时收集荧光。试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和Ct值判定结果。

4.2 结果判定

4.2.1 结果分析条件的设定 阈值设定原则：根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过阴性对照品扩增曲线的最高点为准。对于多通道荧光 PCR 仪，选定 FAM(465-510)检测通道读取检测结果，ABI 仪器选择 5' FAM；3' MGB 淬灭基团。

4.2.2 质控标准

- 阴性对照无 Ct/Cp 值并且无扩增曲线。
- 阳性对照的 Ct/Cp 值应小于等于 30，并出现典型的扩增曲线。
- 如阴性和阳性对照不满足以上条件，此次实验视为无效。

4.2.3 结果判定

- 阴性：无 Ct/Cp 值，且无特征性扩增曲线，表明样品为阴性。
- 阳性：Ct/Cp 值≤30.0，且出现典型的扩增曲线，表示样品为阳性，含有猪伪狂犬病毒核酸。
- Ct/Cp 值大于 30.0，且出现典型的扩增曲线的样品建议复验。复验仍出现上述结果的，判为阳性，否则判为阴性。

【注意事项】

- 实验室应至少分三个区：样品处理区、反应混合物配制区和检测区。
- 各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染。检测结束后，应立即对工作台进行清洁。
- 分装反应液时，应尽量避免产生气泡。上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
- 阳性对照在吸取前应在微量漩涡振荡器上剧烈振荡 1~2 秒。
- 试剂盒中各组分应避免反复冻融。

【规格】 50 份/盒

【贮藏与有效期】 荧光 RT-PCR 检测试剂盒-20°C 保存，有效期为 12 个月；《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》室温保存。