

牛结节疹病毒荧光 PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for Lumpy skin disease(LSD)

(50 reactions)

1、试剂盒简介

货号：HB-504-2

牛结节疹又称牛结节性皮肤病 (lumpy skin disease, LSD, knopvelsiekte) 是牛的一种痘病毒病，特征为发烧、皮肤、粘膜和内脏组织出现结节、消瘦、淋巴结增大、皮肤水肿等，有时可致死。羊痘病毒属不同毒株均与该病有关，与引起山羊痘和绵羊痘的痘病毒在抗原性上难以区分，但在遗传学上存在差异。LSD 主要通过昆虫传播，无昆虫媒介的自然接触传播效率不高。本试剂盒是依据 SN/T 5197-2019《牛结节疹病毒荧光定量 PCR 操作规程》相关标准中推荐的荧光 PCR 引物和探针配制，此标准的序列是针对 ITR 区域设计的一对仅在牛结节疹病毒基因保守的特异性引物和一条特异性的荧光双标记 MGB 探针，是能够区分开绵羊痘病毒和山羊痘病毒，特异性的检出牛结节疹病毒，探针的 5'端和 3'端分别标记不同的荧光素，5'端标记 FAM 荧光素，3'端为 MGB 修饰。

2、试剂盒组成

试剂盒具体组成参见表 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
LSD 荧光 PCR 反应液	750μL × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
LSD 荧光阳性对照	1ml × 1 管

(注：样品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）中牛结节疹病毒的 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

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

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：010-50933811, 13718421576, 17718526815

客服 QQ：737481857 835171324

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
用量	15 μL	0.5 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。（阳性对照不需要提取核酸，可以直接吹打混匀后吸取当模板）

4.1.2.3 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：

第一阶段，94℃/30 sec；

第二阶段，94℃/5 sec，60 °C/34 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 值并且无扩增曲线。
- 阳性对照的 Ct 值应小于等于 28，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：无特异性扩增曲线或 Ct 值 > 40，表明样品为牛结节疹病毒核酸阴性。
- 阳性：Ct 值 ≤ 35.0，且出现典型的扩增曲线，表示样品为阳性，含有牛结节疹病毒核酸。
- 临界值有效判定原则：35.0 < Ct 值 ≤ 40.0 的样本应重做，重做结果无 Ct 值且无明显扩增曲线则为阴性，而有 Ct 值且有明显扩增曲线则为阳性。

【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 PCR 检测试剂盒-20℃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。

引物探针序列信息来源于 SN/T5197-2019《牛结节疹病毒荧光定量 PCR 操作规程》：

F: 5' -TTGTCAGAAACGAGG-3'

R: 5' -ATGCCTCACTTGTATTTGG-3'

P: FAM 5' -TCTTGCTAAAATACCA-3' MGB

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：010-50933811, 13718421576, 17718526815

客服 QQ: 737481857 835171324