

【产品信息】

产品货号: TS-ASFV-04V

产品规格: 500 头份

使用范围: 仅限于科学研究及实验室自检, 不可直接用于兽医诊断。

【试剂组成】

组分货号	组分名称	包装规格	数量	保存温度
QPT-200U-WS	TOROIVD® 5G qPCR Premix with UNG-WS-	1.25mL/管	4 管	2-8℃
TS-PPM-A04V	天筛®非瘟 VP72+IC 反应液 IV	1.25mL/管	2 管	2-8℃避光

【试剂准备】

- 准备工作:** 将所有试剂恢复到室温, 完全融化后涡旋振荡混匀 10 秒, 6000 转离心 10 秒。
- 反应体系配制:** 以 48 次为例进行体系配制: 取 1.5mL 无核酸酶离心管, 加入 500μL TOROIVD® 5G qPCR Premix with UNG-WS-(酶混合液)及 250μL 天筛®非瘟 VP72+IC 反应液 IV(引物探针混合液)配成荧光定量 PCR 反应液。涡旋振荡混匀 10 秒, 6000 转离心 10 秒。
备注: 其它次数可以按如上比例等比放大和缩小, 酶混合液: 引物探针混合液按 2:1 混合即可。
- 反应体系分管:** 将反应体系按 15μL /管分装至对应的定量 PCR 八连管中。
备注: 若分装的反应管不能一次用完, 建议 2-8℃保存 2 周内用完。

【模板加样】

- 核酸提取:** 按核酸提取试剂操作说明进行提取纯化样品中的非洲猪瘟 DNA 模板。
- 模板加样:** 取 5μL 阴性对照, 核酸提取模板及阳性对照分别加入 PCR 扩增管中, 将枪头插入液面以下缓缓注入模板, 盖上八连管盖, 离心 6000 rpm 10 秒后直接上机。
备注: -加入液面下的方式, 减少模板挥发, 有助于提高极低 copies 模板的检测灵敏度。
-先加阴性, 后加模板, 最后加阳性对照, 避免污染; 尤其加阳性对照时要特别小心, 以防气溶胶。

【仪器设置】

- 荧光通道设置:** FAM 通道- VP72 基因, VIC 通道-猪 actin 内参基因。
- 普通反应程序设置:**

针对 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 检测系统按如下条件设置:

步骤	反应温度	时间	是否采集荧光	循环数
预变性	95℃	5min	否	1
PCR 扩增	95℃	10 秒	否	40
	60℃	30 秒	是	

备注: 该循环条件为最保守循环条件,也可适用于所有其它型号定量 PCR 仪。

针对 Roche LightCycler 96, ABI Step One Plus, 西安天隆 Gentier 96R 和 Gentier 48E, 杭州博日 LineGene 9600 Plus, Biorad CFX 96, ABI QuantStudio 1 等实时荧光定量 PCR 检测系统可采用如下程序设置:

步骤	反应温度	时间	是否采集荧光	循环数
预变性	95℃	5min	否	1
PCR 扩增	95℃	10 秒	否	40
	60℃	20 秒	是	

备注: Roche LightCycler 96, ABI Step One Plus, Biorad CFX 96 建议使用 100μL 乳白色定量 PCR 八连管, 其它仪器均使用 200μL 透明定量 PCR 八连管。

3.超快速反应程序设置:

针对西安天隆 Gentier 48E 可使用超快速程序, 将仪器升温速率设置为 8℃/秒, 降温速率设置为 6℃/秒, 循环条件设置如下:

步骤	反应温度	时间	是否采集荧光	循环数
预变性	95℃	3min	否	1
PCR 扩增	95℃	1 秒	否	40
	60℃	5 秒	是	

备注: 本反应程序可以在不降低灵敏度的情况下, 实现 27min 完成检测。

【数据分析】

1. 当使用 QuantStudio 1/3/5 实时定量 PCR 系统; ABI 7500/7300, Step one plus 定量 PCR 系统等含“ROX 分析”系统时, 需选无 ROX 校正分析。
2. 当使用西安天隆 Gentier 96E/96R, Gentier 48E, Gentier 32R, Gentier mini 荧光定量 PCR 仪含“基线增益校正”分析系统, 需含“基线增益校正”分析。

【结果判定】

请参考如下表进行判定结果, 仅限科研及实验室自检, 不做兽医临床诊断依据。

结果	阳性对照孔	阴性对照孔	FAM-VP72	VIC-内参	结果判定
1	Ct≤30	No Ct	Ct≤40	Ct≤35	非洲猪瘟阳性
2	Ct≤30	No Ct	No Ct	Ct≤35	非洲猪瘟阴性
3	Ct≤30	No Ct	No Ct	Ct≥35 或 No Ct	请重新提取模板或采样
4	Ct≤30	Ct≤40	Ct≤40	Ct≤40	请排除污染后复检
5	No Ct	No Ct	No Ct	Ct≤40 或 No Ct	阳性模板失效或试剂失效

本试剂组不提供阳性对照, 请自行准备。

更详细说明书请联系天罗诊断科技江苏有限公司, 我们以电子邮件形式发送。