

猪繁殖与呼吸综合征病毒（北美株/欧洲株）双重荧光 RT-PCR 检测试剂盒

使用说明书（VTF0001）

Ve2023©version1.0



名称和用途

PRRS 1 型和 2 型双重荧光定量试剂盒用于检测猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）核糖核酸并对基因 1 型（欧洲）和 2 型（北美）进行分型。该试剂盒可用于猪血清、口腔液、精液和肺组织提取的 RNA 中 PRRSV 的检测。血清和肺组织样本可以五混一进行检测，唾液样本可以来自于一个猪栏收集的混合样本。

概述

猪繁殖和呼吸障碍综合症主要由猪繁殖和呼吸障碍综合症病毒（PRRSV）所引起。本试剂盒提供了一种高度敏感性和特异性的方法来检测 PRRSV 病毒的 RNA，同时对 1 型和 2 型进行分型。试剂盒反应液中含有 PRRSV 基因 2 型（FAM 标记）和基因 1 型（VIC 标记）的特异性引物和探针，若在添加的模板中含有 PRRSV 病毒核酸，若为基因 2 型则 FAM 通道的荧光信号得以释放，若为基因 1 型则 VIC 通道的荧光信号得以释放，仪器收集到相应通道的信号呈现出典型的扩增曲线。同时本产品采用化学和抗体双重修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶进行扩增，在保证扩增效果的同时极大地提高了特异性，同时具有定量准确、扩增效率高、重复性好和可信范围宽的特点。另外引入了 UDG 防污染体系，可高效防止因 PCR 产物污染引起的假阳性结果。

自备器材

1. RNA 提取试剂盒；
2. 带制冷功能的离心机；
3. 10 μ L、200 μ L、1000 μ L 量程单通道移液器；
4. 无菌无酶一次性吸头（10 μ L、200 μ L、1000 μ L）；
5. 无菌无酶的 EP 管（配制反应液用）；
6. 荧光定量 PCR 反应管/板；
7. 实时定量 PCR 仪。

组份

序号	组份	规格 × 数量	
		50T	100T
1	RT-qPCR 酶 Mix（防污染）	150 μ L × 1 管	150 μ L × 2 管
2	PRRSV NA-Eu RT-qPCR 反应液	1ml × 1 管	1ml × 2 管
3	PRRSV NA-Eu 阳性对照	1ml × 1 管	1ml × 1 管
4	阴性对照	1ml × 1 管	1ml × 1 管
5	说明书	1 份	1 份

- 组分 1 中加入了 UDG 防污染系统，可以有效地防止因 PCR 产物污染引起的假阳性结果。组分 2 中包括上下游扩增引物、P72 基因的 taqman 探针、Buffer 以及 Nuclease-free ddH₂O。

适用机型

ABI 系列、Bio-Rad 系列、Agilent Strata gene MX 系列、Roche Light Cycler R480、Cepheid SmartCycler、Rotor-Gene 系列以及国产系列多通道实时荧光定量 PCR 仪。

注意事项

- 1) 为保证检测结果的准确性，被检样本应尽可能新鲜，样本在采集、运输、储存以及处理过程中注意环境条件，尽量保持低温并使用无菌无酶级别耗材，防止核酸降解和交叉污染。被检样本在采集、运输、储存以及处理过程中操作不当，造成核酸降解则会产生假阴性结果；若发生交叉污染，则会产生假阳性结果。
- 2) 试剂盒内液体试剂在使用前请充分融化，瞬时离心；使用时请置于冰上，短时间内多次使用可在 4℃ 暂存，应尽量避免反复冻融。
- 3) 每轮 PCR 反应都应设置阴阳性对照，以排除操作失误。
- 4) 反应液配液完成后请立即上机检测；仪器扩增相关参数应按照本说明书进行设置。
- 5) 反应结束后 PCR 反应管禁止开盖，为避免扩增产物的气溶胶污染，建议将反应后的 PCR 管放入自封袋中进行热塑封后再丢弃；热塑封前，勿将 PCR 管随意丢入垃圾桶内，应保持直立放置（否则管内扩增产物渗漏挥发造成气溶胶污染）。

● 样品准备

1. 取猪唾液、全血、肺组织、扁桃体、淋巴结、脾等样本，死胎或流产胎儿的脾脏组织、肺组织或胸水等样本，样本处理方法按照核酸提取试剂盒说明书进行操作。
2. 应避免样本间交叉污染。
3. 样本采集后应立即提取核酸检测，若不能立即检测，应置于-80℃暂存。
4. 为了达到本试剂盒的最佳检测效果，待检测样本需进行核酸提取后扩增，不推荐快速裂解处理。客户请自备核酸提取试剂并参考相应提取说明书进行操作。提取好的核酸须在 2 小时内进行 PCR 扩增，长期保存需添加 RNase 抑制剂放置于-20℃，避免反复冻融。

● 操作步骤

➤ 实验前准备

室温下融解RT-qPCR 酶Mix (防污染)，然后置于4℃备用，待完全融解后，上下颠倒或轻微震荡混匀，防止产生气泡，最后瞬时离心。

反应体系	qRT-PCR Mix (防污染)	2.5μL*N
	PRRSV NA-Eu RT-qPCR 反应液	17.5μL*N

1) 试剂准备

核算当次实验所需要的反应次数 (N)，根据下表计算当次实验所需要的各种试剂组分的总用量。

$N = \text{本次实验的样本数} + 3$ (阴性 阳性对照 误差预留量)

2) 配液

在无菌的EP管中加入核算好的本次实验所需试剂量，充分混匀后瞬时离心。然后按照20μL/每管分装至PCR反应管中。

3) 加样

取出上面准备好的PCR反应管，在其中两个PCR反应管中分别加入阴性对照5μL、阳性对照核酸5μL，其他PCR反应管中分别加入5μL的待检测样本核酸达到终体积25μL。盖紧PCR 反应管盖，轻弹PCR 管身充分混匀反应液，最后低速瞬时离心。

4) PCR 扩增

取出样本处理区准备好的PCR 反应管，放置在实时荧光定量PCR 仪的样品槽的相应位置，并记录放置顺序。按照下表的相关参数设置仪器，进行PCR扩增。

PCR 反应程序

通道选择	FAM 通道	采集 PRRSV (北美株) 荧光信号		
	VIC 通道	采集 PRRSV (欧洲株) 荧光信号		
	步骤	条件	采集荧光	循环数
PCR 反应条件	防污染	37℃ 2min	否	1
	反转录	50℃ 15min	否	1
	预变性	95℃ 3min	否	1
	PCR 扩增	95℃ 10s	否	45
60℃ 30s		是		

5) 结果判定

扩增结束后，根据Ct 值及扩增曲线，进行结果判定。

● 结果判定

【检验结果的判定】

1. 阈值线：可根据不同仪器的噪音适当调整阈值线，以盖过正常阴性对照的扩增曲线最高点为准。

2. 试剂盒有效性判定：

(1) 阳性对照：Ct 值≤32 且有典型 S 型扩增曲线。

(2) 阴性对照：无 Ct 值，线形为直线或轻微斜线，无指数增长长期。

3. 标本结果判定：

FAM 通道为 PRRSV (北美株) 病毒检测结果；

VIC 通道为 PRRSV (欧洲株) 病毒检测结果。

(1) 阳性：样本检测结果 Ct 值 < 38 且有明显指数增长。

(2) 可疑：样本检测结果 Ct 值在 38 ~ 42 范围内，此时应重新采样提取核酸后复检，如重复实验结果 Ct 值仍在 38 ~ 42 范围内，有明显指数增长趋势，则判定为阳性，否则为阴性。

(3) 阴性：样本检测结果 Ct 值 > 42 或无 Ct 值。

【产品性能指标】

产品的最低检出限为 10³Copies/mL，产品 CV 值≤5%。

【贮存条件及有效期】

-20℃储存，避免反复冻融，如储存条件适宜，可保存 12 个月。