

绵羊痘病毒荧光 PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time PCR for Sheeppox virus (SPPV)

(50 reactions)

1、试剂盒简介

货号：HB-523

绵羊痘 Sheeppox virus (SPPV) 是一种引起绵羊热性接触性传染病的病毒。以发热、全身痘疹或结节、内脏病变和死亡为特征。本试剂盒是根据 2019 年 OIE 第 3.7.12 绵羊痘和山羊痘中推荐的文献 BALINSKY C. A, DELHON G, SMOLIGA G, PRARAT M, FRENCH R. A, GEARY S. J, ROCK D. L & RODRIGUEZ L. L. (2008). Rapid preclinical detection of sheep pox virus by a real-time PCR assay. J. Clin. Microbiol., 46, 438 - 442 中检测绵羊痘病毒的引物探针序列。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
绵羊痘荧光 PCR 反应液	750μL × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	20μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
绵羊痘荧光阳性对照	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) 中绵羊痘病毒的 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

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

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

电话: 010-50933811, 13718421576, 17718526815

邮 箱: haisentong@126.com

客服 QQ: 737481857 835171324

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 μ L	0.25 μ L

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 μ L 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 10 μ L，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 $^{\circ}$ C/2 min；

第二阶段，94 $^{\circ}$ C/15 sec，60 $^{\circ}$ C/1 min，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 40，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 值，且无特征性扩增曲线，表明样品为绵羊痘病毒核酸阴性。
- 阳性：Ct 值 \leq 40.0，且出现典型的扩增曲线，表示样品为阳性，含有绵羊痘病毒核酸。

【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 $^{\circ}$ 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。