

病毒核酸提取方案-非洲猪瘟篇

背景介绍

非洲猪瘟 (African Swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (African Swine fever virus, ASFV, 双链 DNA 病毒, 大小 170—190kb) 感染猪引起的传染病, 是我国重点防范的一类动物疫情, 死亡率近达 100%。目前 ASF 防疫无可疫苗。虽说 ASF 不感染人, 但对养猪业是一个毁灭性的打击, 猪的死亡率可达 100%。中国是养猪大国, 中国人猪肉量消费极高, 金额达 1.6 万亿, 带动其他产业 3 万多亿, 疫情控制问题对养猪业乃至对国计民生影响非常大。

天根生化科技 (北京) 有限公司作为中国核酸提取及检测领域的专家, 为中国 ASF 诊断及预防推出快速准确完成病毒提取和检测的整体解决方案。其中检测方案相关的仪器及试剂已经应用到山东、河南、湖南、湖北、四川、广西、广东、辽宁、内蒙、吉林、黑龙江、河北、北京、山西、重庆、福建、江西、浙江、江苏、贵州、陕西等省份, 并提供了几百万份 ASF 样本的病毒核酸提取试剂。

样本类型

抗凝血、血清、淋巴结、脾脏、扁桃体、肝脏、肾脏、棉拭子 (活)、粪便 (活) 等多种类型。

样本特点

组织类样本成分相对单一, 血清、血浆、拭子、粪便类样本核酸含量较低, 杂质较多, 对试剂灵敏度和抗逆性要求高。

样本保存

血清血浆等体液样本、新鲜组织样本、粪便样本, 如不能马上进行提取, 需置于低温中保存, 避免反复冻融。拭子样本可使用拭子保存液进行保存。

样本前处理

血浆/血清/淋巴液/无细胞体液/细胞培养上清液/尿液样本平衡至室温后, 可直接参考说明书加入相应缓冲液进行提取。

鼻拭子/咽拭子: 取样后与生理盐水或病毒运输液彻底颠倒或涡旋振荡混匀取相应液体进行病毒提取。

粪便样本: 0.5—1 ml 粪便样本悬浮于 5 ml 生理盐水中, 彻底涡旋振荡混匀后, 4000×g (6000 × rpm) 离心 20 分钟后取上清进行病毒提取。

血液样本: 血液样本可离心得到血清/血浆后进行病毒提取。

组织样本：可参考如下表格进行前处理。

前处理方法	方法特点	耗材或仪器	适用客户类型
手工法	操作时间长， 通量低	研钵、玻璃珠等	样本数量较少，针对难研磨的样本（根、种子等）
组织研磨器法	简便省时， 通量低	<u>TGrinder 电动组织研磨器套装 (OSEY30/Y40)</u> <u>TGrinder 第三代变速组织研磨器套装 (OSE-Y50)</u>	样本数量较少，便于手工操作
均质仪法	简便省时， 研磨充分， 通量高，	<u>TGrinder H24 组织研磨均质仪 (OSE-TH-01, TIANGEN)</u>	样本数量相对较多，TGrinder H24 可同时研磨 24 个样本。

注意事项

1. 样品应避免反复冻融，否则会导致核酸提取量降低。样本可立即进行提取，也可于 4℃ 保存待测，保存时间不超过 24 小时。长期保存可置于 -20℃ 或 -80℃ 冷冻保存。
2. Carrier RNA 的需遵照说明书使用，冻干粉不能直接溶解于缓冲液 GB 中，必须先溶解在 RNase-Free ddH₂O 中，再溶解至缓冲液 GB 中；为避免溶液出现起泡现象，请勿使用涡旋振荡。
3. 操作过程要特别注意防止核酸降解。所使用的器皿、加样器等均应为专用，离心管、枪头等一次性耗材需进行高压灭菌。操作人员应戴无粉手套、口罩等。
4. 临床样本等需在超净台或生物安全柜中进行。
5. 妥善处置所用样本及试剂材料，彻底清洗并消毒所用操作台面。

方案介绍

TIANGEN 根据非洲猪瘟样本的特点，推出了非洲猪瘟病毒核酸提取试剂盒，可实现从不同类型非洲猪瘟样本中高效分离纯化高质量核酸。

方案分类	产品名称	产品特点	适用客户类型
柱法方案	<u>病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒 (DP315)</u>	适用于不同类型样本中快速纯化得到高质量病毒 DNA/RNA，重复性强，产量高，完全去除污染物和抑制剂，方便下游实验。	样本数量较少，习惯于手工操作
磁珠法方案	<u>磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒 (DP438)</u>	磁珠法散装试剂，适用于不同类型样本分离纯化高质量病毒 DNA/RNA，整个提取过程安全、便捷、得率高、纯度高、质量稳定可靠，可整合高通量工作站自动化提取。	样本数量较少，习惯于手工操作，需配备 <u>磁力架 (OSE-MF-01, TIANGEN)</u> 。可整合不同平台仪器。。

TGuide S32 配套方案	<u>TGuide S32 磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒 (DP604)</u>	专为 <u>TGuide S32 全自动核酸提取纯化仪 (YOSE-S32, TIANGEN)</u> 研发的预分装磁珠法试剂盒, 可实现 32 个样本的高通量自动化提取。	样本数量多, 有自动化提取需求, 对实验结果均一化要求高, 或人力紧缺的客户
注: <u>红色</u> 标出的 TIANGEN 产品可点击, 直接了解产品相关信息			

方案实验结果展示

高通量方案结果展示

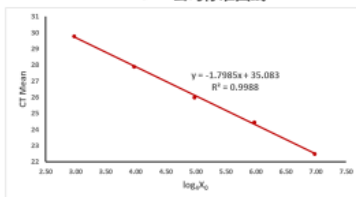
非洲猪瘟病毒提取检测

提取方法: TGuide S32磁珠法病毒DNA/RNA提取试剂盒 (DP604)

下游应用: RT-qPCR

结果展示: 本实验结果由 天根生化科技 (北京) 有限公司 提供

TIANGEN公司标准曲线



TIANGEN	CT值			CT Mean
未稀释	22.465	22.574	22.51	22.517
4×	24.514	24.437	24.496	24.482
16×	25.969	25.989	26.111	26.023
64×	27.97	27.934	27.848	27.917
256×	29.777	29.833	29.766	29.792

实验方法: TGuide S32配套DP604提取试剂盒提取非洲猪瘟病毒 DNA, 采用非洲猪瘟病毒的检测引物及探针, 使用 TIANGEN FP208 FastFire qPCR PreMix (Probe)进行 RT-qPCR 检测, RT-qPCR 检测实验进行 3次技术重复, RT-qPCR 检测仪器为 AB QuantStudio。

结果评价: 使用TGuide S32配套DP604提取试剂盒提取非洲猪瘟病毒 DNA及稀释样本的RT-qPCR定量实验结果表明, 病毒 DNA提取结果良好, 体现为病毒 DNA得率灵敏度高、重复性好, 梯度稀释线性度好, 完全能够满足荧光定量 PCR 等后续实验需求。