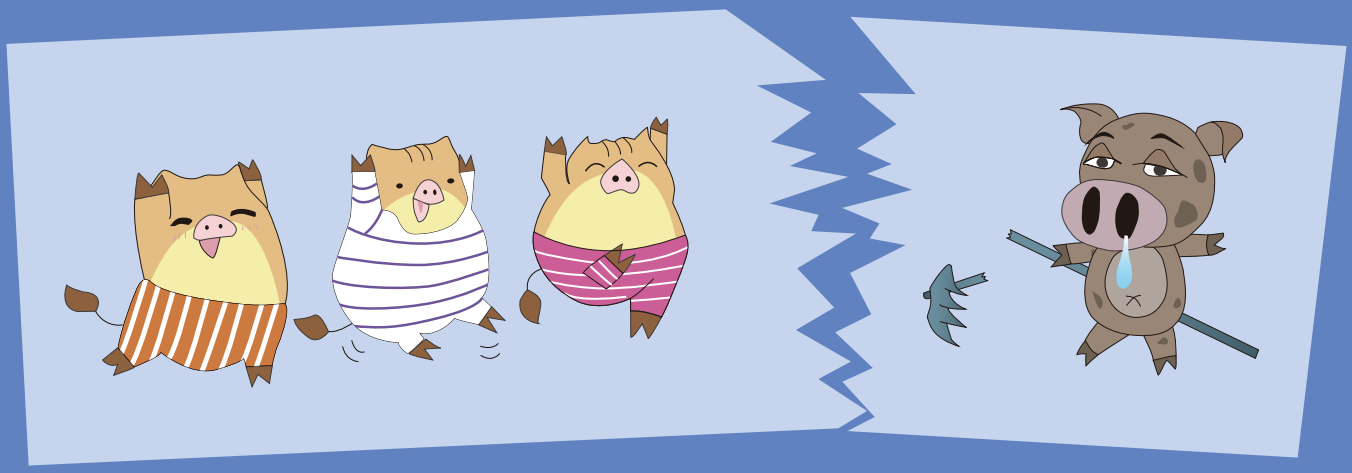
Takara非洲猪瘟病毒检测完整解决方案

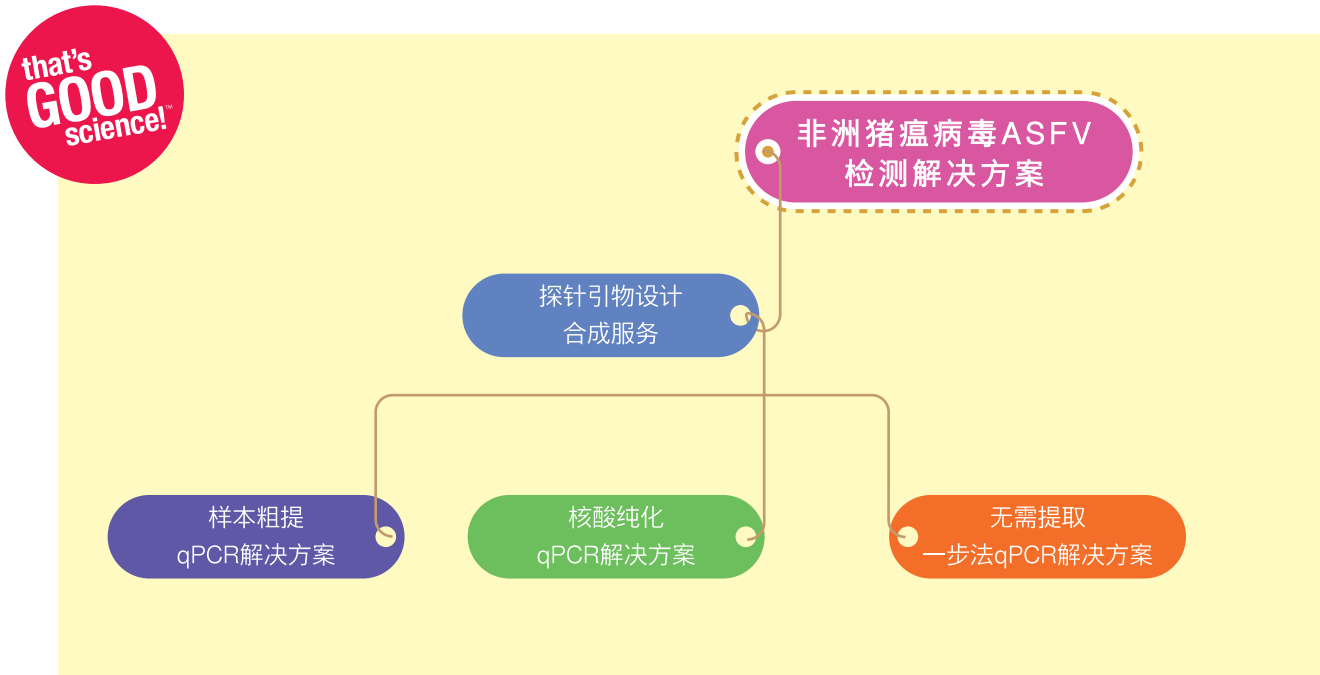


非洲猪瘟病毒（African Swine Fever Virus，ASFV）是一种古老的、高度传染的、能够使家猪和野猪致死的病毒，2018年8月中国确诊首例非洲猪瘟疫情开始，一年多的时间，非洲猪瘟已经席卷了黑龙江、江苏、浙江、内蒙古、辽宁、山西等33个省份，给养殖业带来了巨大损失，猪肉价格也节节攀升登上历史高位。

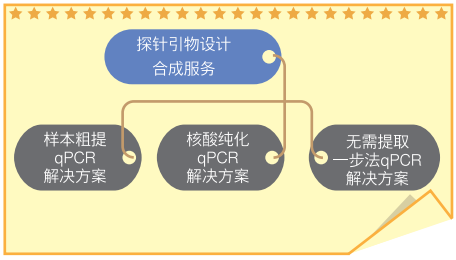
根据最新的研究进展，中科院饶子和院士解析出非洲猪瘟病毒“俄罗斯套娃”似的5层结构，包含3万余个蛋白亚基，这一成果为开发有效的新型非洲猪瘟疫苗奠定了坚实基础。

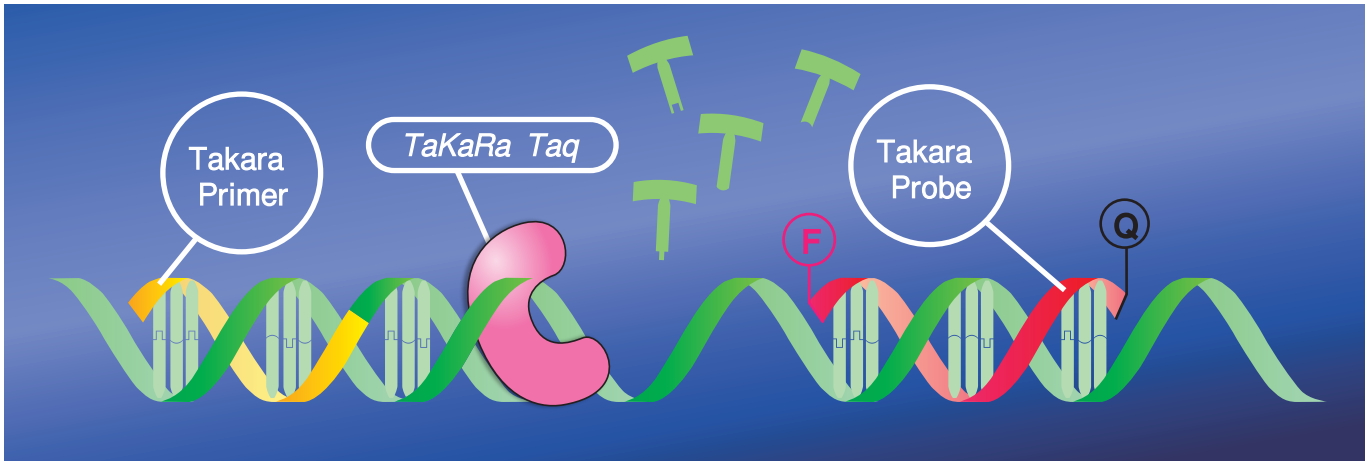
但现阶段，非洲猪瘟疫苗的研发仍在进行中，通过实验室检测，对非洲猪瘟病毒进行快速、可靠的早期诊断，对于防止疫病的传播非常重要和必要的。根据2018年8月中国动物卫生与流行病学中心和中国动物疫病预防控制中心编制的《非洲猪瘟病毒检测操作规程》，需要使用实时荧光定量PCR方法对非洲猪瘟病毒进行检测。

Takara作为分子生物学试剂行业内的重要一员，多年来持续不断地为中国各科研院校、检验检疫单位和各种检测机构提供性能稳定、高效高质量的研究用试剂，受到广大生物学研究人员的支持和好评。Takara可以提供从探针、引物合成到定量PCR检测的多种灵活的非洲猪瘟病毒ASFV检测解决方案。



非洲猪瘟病毒（ASFV）检测用引物、探针设计合成





根据2003年发表于《Journal of Virological Methods》期刊的文献《Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus》，探针法定量PCR扩增ASFV的主要免疫原基因VP72的3´保守区，PCR引物和探针序列如下表：

序号	Oligo名称	碱基序列* (5´ to 3´方向)	碱基数	5´修饰	3´修饰
01	ASFV-引物F	CTG CTC ATG GTA TCA ATC TTA TCG A	25		
02	ASFV-引物R	GAT ACC ACA AGA TC(AG) GCC GT	20		
03	ASFV-探针P	CCA CGG GAG GAA TAC CAA CCC AGT G	25	FAM	TAMRA

* 已经有众多客户在Takara合成上述序列用于ASFV的定量PCR检测。

Takara为您提供两种引物、探针合成方案

设计+合成

- ☐ 提供高质量引物和探针
- ☐ 价格相对较低

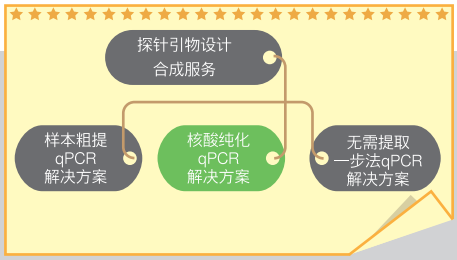
设计+合成+验证

- ☐ 提供qPCR实验验证的引物和探针
- ☐ 无需前期摸索条件，节省时间和试剂

Takara Oligo DNA/RNA合成的优势

- ☆ 二十余年的引物、探针合成经验；
- ☆ 原料控制、生产过程控制，以及质量控制，严格按照ISO质量管理体系进行标准化管理；
- ☆ 完善的品质管理，有效控制Oligo合成的批间差，实现很好的重复性和稳定性；
- ☆ 多种防污染措施，在洁净环境中进行产品的制造和分装。

ASFV检测解决方案1：核酸提取 & qPCR



病毒核酸提取

TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0（Code No. 9765）

TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0（Code No. 9766）

＋

探针法/染料法qPCR试剂

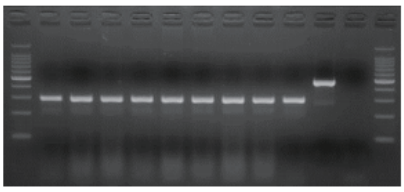
Premix Ex Taq™（Probe qPCR）（Code No. RR390）*

TB Green® *Premix Ex Taq*™ II（Tli RNaseH Plus）（Code No. RR820）*

*2019年6月，中国动物疫病预防控制中心公布认可的非洲猪瘟快检试剂生产企业中，部分企业使用了该方案作为ASFV检测试剂盒的原料。

TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0（Code No. 9766）是专门用于从血浆、全血、无细胞体液、病毒原液和感染病毒的组织中提取各种病毒（Virus）RNA/DNA的小量纯化试剂盒，具有高效、快速、方便之特点，病毒裂解后，提取操作仅需20分钟便可完成。

从HL60细胞培养液、全血、唾液、尿液、小鼠肝脏中提取HAV病毒RNA，并进行RT-PCR检测的实验例。使用本试剂盒从200 μl培养细胞（HL60）、10 μl全血、200 μl唾液、200 μl尿液、10 mg小鼠肝脏中提取HAV RNA，并使用TaKaRa One Step RNA PCR Kit（AMV）(Code No. RR024)进行RT-PCR得到289 bp片段，其电泳结果见右图。



1% Agarose凝胶电泳图

M: 100 bp DNA Ladder（Dye Plus）

1.2: HL60细胞培养液中HAV检测结果

3.4: 全血中HAV检测结果

5.6: 唾液中HAV检测结果

7.8: 尿液中HAV检测结果

9: 小鼠肝脏中HAV检测结果

+/−: 正负对照(Code No. RR024)

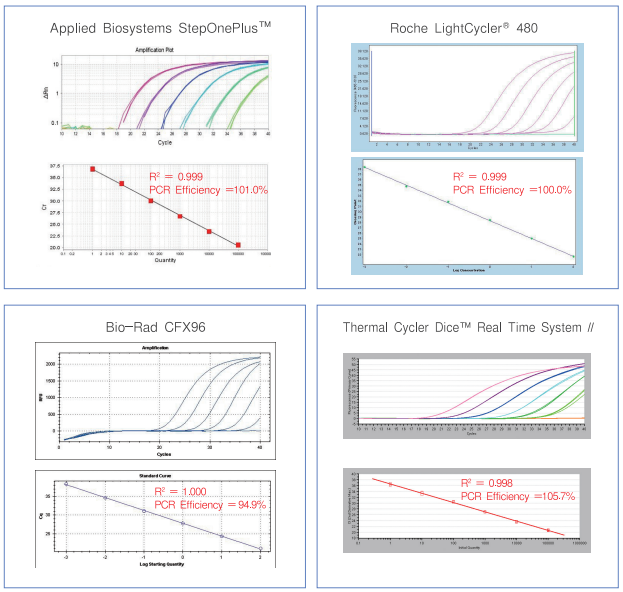
从HL60细胞培养液、全血、唾液、尿液、小鼠肝脏中提取HAV病毒RNA，并进行RT-PCR检测的实验例

***Premix Ex Taq*™（Probe qPCR）（Code No. RR390）**是采用探针法进行Real Time PCR（qPCR）反应的专用试剂，可用于快速PCR。*Premix Ex Taq*是一种2×浓度的Premix Type试剂，进行实验时，PCR反应液的配制十分方便简单。

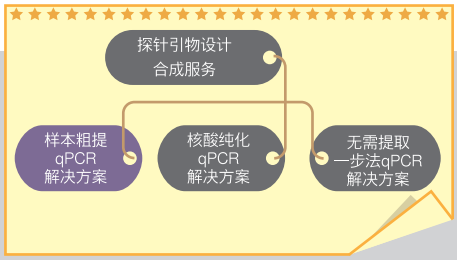
Mix中添加了Tli RNaseH（耐热性RNaseH），以cDNA作为模板进行PCR反应时，可以很好地抑制由于cDNA中残存mRNA对PCR反应造成的阻害作用。
本制品可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因进行准确定量、检测，重复性好，可信度高。

- 模板　：小鼠肝脏来源的cDNA(相当于1 pg～100 ng Total RNA)
- 目的基因　：*Ywhae*
- qPCR试剂：本制品(Code No. RR390A)

<在各种Real Time PCR仪上反应稳定>



ASFV检测解决方案2：样本粗提 & qPCR



样本DNA快速提取
MightyPrep reagent for DNA（Code No. 9182）*

＋ **阻害物抵抗性高的qPCR试剂** Probe qPCR Mix（Code No. RR391A）*

*2019年6月，中国动物疫病预防控制中心公布认可的非洲猪瘟快检试剂生产企业中，部分企业使用了该方案作为ASFV检测试剂盒的原料。

MightyPrep reagent for DNA（Code No. 9182）是用于从小鼠尾等动物组织及植物组织、血液、加工食品、土壤、菌体等中简便、高收量的制备PCR用模板DNA的试剂。使用时在样品中添加本试剂，仅需95℃加热10分钟即可简易提取DNA。

特 点

- 添加试剂（MightyPrep reagent for DNA）后，仅需95℃加热10分钟即可简易提取DNA。
- 只有一种添加试剂！可直接使用。
- 与阻害物抵抗性高的PCR试剂配套使用，可对宽广范围内的样品进行PCR扩增。

	MightyPrep reagent for DNA
原 理	热提取
样品量（在100 μl 本试剂中）	・血液 2～20 μl ・小鼠尾 1～2 mm ・植物 1～10 mm² ・土壤 ～0.5 mg 等
适用的细菌、酵母	革兰氏阴性菌 ・*Salmonella enterica* var. Enteritidis ・*Escherichia coli* 革兰氏阳性菌 ・*Enterococcus faecalis* ・*Bacillus subtilis* ・*Staphylococcus aureus* 酵母 ・*Candida boidinii* ・*Candida tropicalis* ・*Saccharomyces cerevisiae* 等
操作时间	～15 分钟

操作流程

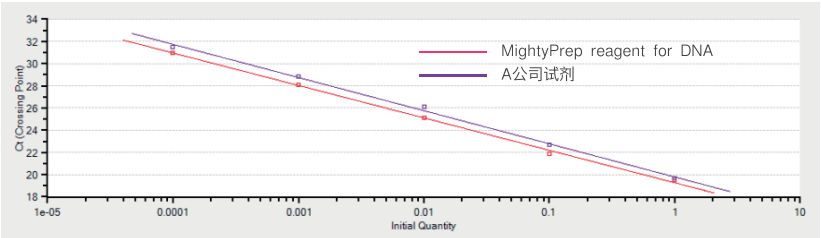
15分钟的快速操作

将样品采集到1.5 ml Microtube中
↓
添加100 μl MightyPrep reagent for DNA后，振荡器混合
↓
95℃加热10分钟
↓
12,000～15,000 rpm离心2分钟
↓
上清作为PCR反应的模板

实验例

从牛乳中提取沙门氏菌DNA

Salmonella enterica var. Enteritidis的菌体悬浮液用牛乳稀释后作为样品，使用本制品和A公司制品制备DNA提取液后，使用CycleavePCR™ *Salmonella* Detection Kit Ver.2（Code No. CY205）进行了沙门氏菌检测。
使用MightyPrep reagent for DNA比使用A公司试剂时Ct值低，能够进行良好的检测。

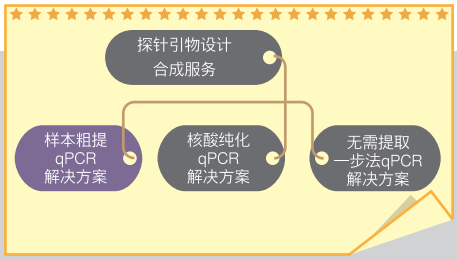


稀释率

（Takara Bio Inc. 比较结果）

	Ct值	
DNA提取试剂	MightyPrep	A公司试剂
原液	19.5	19.65
1/10稀释液	21.85	22.7
1/100稀释液	25.1	26.08
1/1000稀释液	28.11	28.85
1/10000稀释液	30.99	31.52

ASFV检测解决方案2：样本粗提 & qPCR



样本DNA快速提取
MightyPrep reagent for DNA（Code No. 9182）*

＋ **阻害物抵抗性高的qPCR试剂** Probe qPCR Mix（Code No. RR391A）*

*2019年6月，中国动物疫病预防控制中心公布认可的非洲猪瘟快检试剂生产企业中，部分企业使用了该方案作为ASFV检测试剂盒的原料。

Probe qPCR Mix（Code No. RR391A）是采用探针法进行Real Time PCR（qPCR）检测的试剂。通过对添加了抗体的Hot Start PCR酶和Real Time PCR用Buffer分别进行了改良，实现了PCR阻害物抵抗性高、扩增特异性高、扩增效率高、检测灵敏度高。

特 点

- **增强了对PCR阻害物的抵抗性**

  在进行食品和环境来源样品的靶基因DNA检测及基因分型时，受PCR反应阻害物影响导致检测灵敏度下降及假阴性结果困扰的研究人员请一定尝试使用！

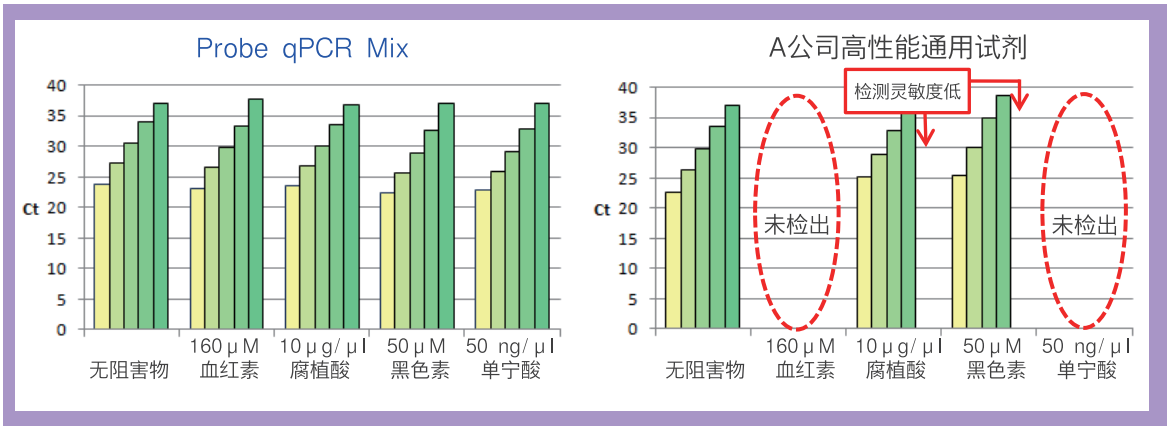
- **适用于快速qPCR反应条件**

  已证实使用各公司qPCR扩增仪均可以进行良好的扩增反应。即使在反应时间为40分钟的快速PCR反应条件下也可获得重复性高的PCR结果。

实验例

各种PCR阻害物对Ct值的影响评价

已知血红素（血液成分）、腐植酸（土壤成分）、黑色素（皮肤和毛发成分）、单宁酸（植物成分）对PCR反应有很强的阻害作用，对在PCR反应中添加PCR阻害物的反应体系和未添加PCR阻害物的反应体系进行了Ct值比较。
本制品同其他公司同类制品相比，对PCR阻害物的抵抗性显著提高，使用目前为止不能获得良好反应结果的检测样品也能够期待获得高成功率、高检测灵敏度的PCR反应。



模板：HL60基因组DNA
- 170 ng
- 17 ng
- 1.7 ng
- 170 ng
- 17 pg/20 μl反应体系

- 靶基因 ： 人*ACTB*（使用 Dual Labeled Probe）
- qPCR扩增仪 ： ABI 7500 Fast System
- qPCR反应条件 ： 95℃ 20 sec；95℃ 3 sec / 60℃ 30 sec] 40 cycles

反应时间：39分钟

（Takara Bio Inc.比较结果）

ASFV解决方案3：无需提取・直接qPCR

血液、尿液、粪便、细胞等直接进行一步法RT-qPCR

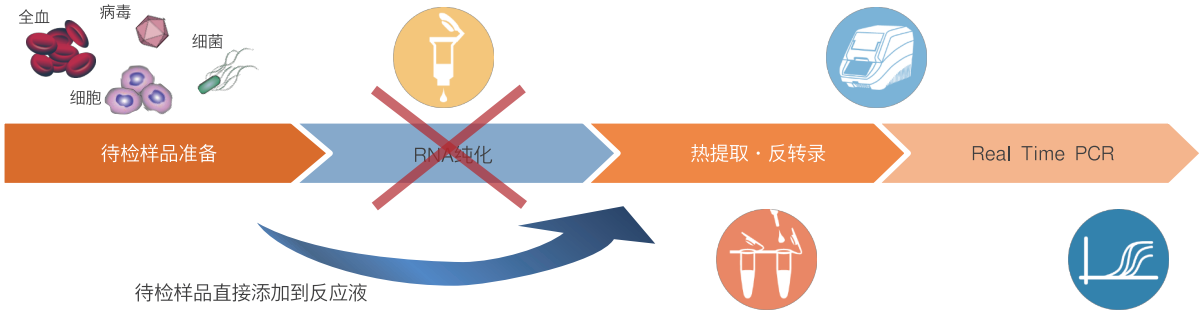
PrimeDirect® Probe RT-qPCR Mix (or with UNG)
（Code No. RR650/RR651）

PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix (or with UNG)（Code No. RR650/RR651）是基于探针法检测的一步法Real Time RT-PCR试剂。本制品为2× premix型试剂，只需添加用于检测目的基因的引物、探针和模板即可进行反应。由于本制品在反应液中能够直接从生物样本中提取核酸，对于含有RNA病毒等的生物样品，可直接添加到反应液中进行Real Time PCR反应。由于核酸提取、反转录、qPCR各反应连续进行，大大提高了操作简便性，减少了反应时间。

特　点

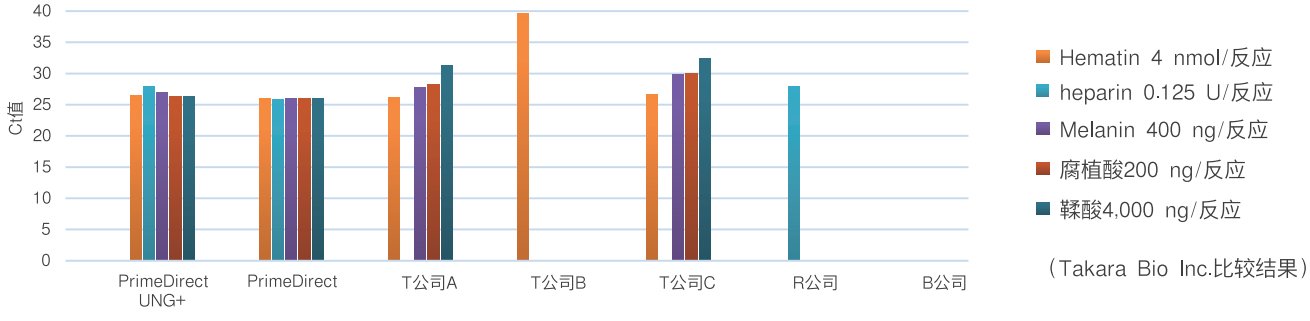
活体样品起始简便快速进行Real Time PCR检测

- 探针法one step RT-qPCR premix试剂
- 血液、尿液等样品无需RNA纯化也可进行Real Time PCR
- 通过UNG的作用，可以有效防止carryover contamination产生的假阳性
  ※使用PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, with UNG（Code No. RR651）时



实验例

对各种阻害物质的高耐受性



（Takara Bio Inc.比较结果）

检测了PrimeDirect及各公司Real Time one step RT-PCR试剂对反应阻害物质的耐受性。
针对于各种阻害物质，PrimeDirect显示具有很高的耐受性。
模板RNA：Human Hela total RNA　　target：Human ACTB　　Probe：Takara qPCR Probe

Takara可以提供包括环境处理、Carryover污染处理、核酸提取、RNA体外转录、荧光定量PCR各组分在内的完整的病毒检测解决方案。

产品	Code No.	包装量	用途
DNA-OFF™	9036	500 ml	去除实验区域DNA污染
RNase-OFF™	9037	500 ml	去除RNase污染
MightyPrep reagent for DNA	9182	20 ml	样本DNA粗提试剂
TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0	9766	50 次	柱式法病毒核酸提取
RNAiso Plus	9108	100 ml	试剂型Total RNA提取
Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-)	2641A	10,000 U	高性价比的反转录酶
Recombinant RNase Inhibitor	2313A	5,000 U	RNase抑制剂
Uracil DNA Glycosylase (UNG), heat-labile	2820	200 U	防止Carryover污染导致的假阳性
dU plus dNTP Mixture (12.5 ×)	4035	800 μl	防止Carryover污染导致的假阳性
dNTP Mixture	4030	各3.2 μmol/1.28 ml	PCR底物
dNTP Mixture	4019	各2.5 μmol/250 μl	PCR底物
T7 RNA Polymerase	2540A	5,000 U	RNA标准品的体外转录
RNase-free Water	9012	1 ml×10 支	RNA实验用水
Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)	RR390A	200 次（50 μl反应）	高性价比probe法qPCR试剂
Probe qPCR Mix	RR391A	200 次（50 μl反应）	抗阻害物probe法qPCR试剂
Probe qPCR Mix, with UNG	RR392A	200 次（50 μl反应）	RR391的UNG版本，防止假阳性
One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)	RR064A	100次（50 μl反应）	probe法One Step RT-qPCR
One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix	RR600A	200 次（25 μl反应）	完全premix型probe法One Step RT-qPCR
One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG	RR601A	200 次（25 μl反应）	RR600的UNG版本，防止假阳性
PrimeDirect™ Probe RT-qPCR Mix	RR650A	200 次（25 μl反应）	无需RNA纯化，直接进行probe法One Step RT-qPCR
PrimeDirect™ Probe RT-qPCR Mix, with UNG	RR651A	200 次（25 μl反应）	RR650的UNG版本，防止假阳性

除目录产品的解决方案外，Takara还能提供……
贴牌生产（OEM）和按订单生产

Takara为世界上许多知名的生物技术、生物医药、健康产品提供合同生产服务。我们在高端酶、分子诊断试剂盒成分、细胞生物学产品、生物化学品等领域提供合同生产解决方案。

- **可合同生产的品目**

  目前Takara提供多达上百种产品可进行合同生产。这些产品的品质均达到与Takara，Clontech，Cellartis brands产品的同等标准。

- **可合同生产品目主要的应用领域**

  ① Applied Markets – Diagnostics
  ② Applied Markets – Veterinary Diagnostics
  ③ Applied Markets – AgBio
  ④ Enzymes for Industry Applications
  ⑤ Next Generation Sequencing (NGS)
  ⑥ Genetic Analysis
  ⑦ Viral Transfection & Transduction
  ⑧ Translational Research

- **Takara的高水准合同生产能力**

初步咨询
- 确定您的定制需求
- 建立您的支持团队
- 提供报价/预计交货期

定制配方
- 提供小规模制造
- 提供初步测试样品
- 提供研发支持

制造 & 包装
- 设计定制包装/标签
- 生产定制品/试剂盒
- 按照您的要求进行QC检测

持续的支持
- 提供可靠的产品供应
- 确定交货时间表
- 提供持续的技术支持

- **按订单生产**

  Takara为机构客户提供灵活的客户定制生产。对于我们销售的大多数产品，Takara都提供如下服务：
  ① 定制配方　② 定制包装　③ Glycerol-free　④ 高浓度制品

Takara对于各种形式的商务合作持开放态度，诚挚欢迎您就业务合作与我们取得联系，请发邮件至Bulkorder@takarabiomed.com.cn。

・本宣传页上登载的制品，都是以科研为目的。请不要用于其它方面，如：不要用于人、动物的临床诊断和治疗。也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
・未经本公司许可，严禁产品的转售・转让、以转售・转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
・专利许可信息请在本公司网站上确认：https://www.takarabiomed.com.cn/。
・本宣传页上登载的公司名称及制品名称即使没有特殊标注，使用的也是各公司的商标或注册商标。
・本宣传页仅限于中国大陆地区客户使用，其他地区客户请咨询当地代理商。
・本宣传页上记载的产品信息是2021年3月1日的信息，最新信息请参考公司官网。

Ver.2　2021年3月印刷　1K

宝日医生物技术（北京）有限公司

电话：4006518761　4006518769
E-mail：service@takarabiomed.com.cn
网址：www.takarabiomed.com.cn