

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:13-55700  
低温运输, -20℃保存

**BINGENE**

传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 检测试剂盒

*Infectious Pancreatic Necrosis Virus RT-PCR Kit*

---

使用手册 V1.0

---

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: [www.bingene.com](http://www.bingene.com); 电话: 400-6005850; 电邮: [order@bingene.com](mailto:order@bingene.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>传染性胰脏坏死病病毒 (<i>Infectious Pancreatic Necrosis Virus</i>) 为双 RNA 病毒属 (Birnavirus), 是目前已知鱼类病毒中最小的 RNA 病毒。感染该病毒后常见症状为鱼类游动失调, 常作垂直回转游动, 不久便沉入水底, 伺歇片刻后又重复以上游动, 直至死亡。主要的特征是胰腺坏死, 胰腺泡、胰岛及所有的细胞几乎都发生异常, 多数细胞坏死, 特别是核固缩、核碎裂十分显著, 有些细胞的胞浆内有包涵体。疾病后期, 肾脏的造血组织和肾小管也发生变性、坏死, 肝脏局灶性坏死, 消化道的粘膜发生变性、坏死、剥离。因此快速灵敏诊断传染性胰脏坏死病病毒具有重要意义。本产品就是以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测传染性胰脏坏死病病毒的试剂盒, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 即开即用, 用户只需要提供样品 RNA 模板。</li> <li>2. 产品经过精心优化, 分析灵敏性为 E4 拷贝/反应。</li> <li>3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。</li> <li>4. 特异性高, 引物是根据传染性胰脏坏死病病毒 RNA 高度保守区设计, 只能检测传染性胰脏坏死病病毒, 不会跟除此之外的其他生物的 RNA 发生交叉反应。</li> <li>5. 本产品足够 50 次 20<math>\mu</math>L 体系的 RT-PCR 反应。</li> <li>6. 本产品只能用于定性实验, 不能用于定量实验。</li> <li>7. 本产品只能用于科研。</li> </ol>																					
<p><b>规格及成分</b></p>	<p style="text-align: center;">本产品采用五孔盒包装</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 33%;">成份</th> <th style="width: 33%;">编号</th> <th style="width: 33%;">包装材料</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2<math>\times</math> RT-PCR Buffer</td> <td>91202a</td> <td>500 <math>\mu</math>L 绿盖管</td> </tr> <tr> <td>10<math>\times</math> RT-PCR 酶混合液</td> <td>91202b</td> <td>50 <math>\mu</math>L 红盖管</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>210806</td> <td>1 mL 蓝盖管</td> </tr> <tr> <td>传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 引物混合液</td> <td>yw13-55700af</td> <td>100 <math>\mu</math>L 白盖管</td> </tr> <tr> <td>传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 阳性对照 (1<math>\times</math> 10E4 拷贝/<math>\mu</math>L)</td> <td>pc55700af</td> <td>250 <math>\mu</math>L 黄盖管</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>13-55700sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table> <p>注: 为避免扩散传染性病原, 本产品不提供活体样品做阳性对照, 只提供专一的 DNA 片段作为阳性对照。如果需要 RNA 片段作为阳性对照的需要单独定制。</p>	成份	编号	包装材料	2 $\times$ RT-PCR Buffer	91202a	500 $\mu$ L 绿盖管	10 $\times$ RT-PCR 酶混合液	91202b	50 $\mu$ L 红盖管	超纯水	210806	1 mL 蓝盖管	传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 引物混合液	yw13-55700af	100 $\mu$ L 白盖管	传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ $\mu$ L)	pc55700af	250 $\mu$ L 黄盖管	使用手册	13-55700sc	1 份
成份	编号	包装材料																				
2 $\times$ RT-PCR Buffer	91202a	500 $\mu$ L 绿盖管																				
10 $\times$ RT-PCR 酶混合液	91202b	50 $\mu$ L 红盖管																				
超纯水	210806	1 mL 蓝盖管																				
传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 引物混合液	yw13-55700af	100 $\mu$ L 白盖管																				
传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ $\mu$ L)	pc55700af	250 $\mu$ L 黄盖管																				
使用手册	13-55700sc	1 份																				
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输, -20<math>^{\circ}</math>C 保存, 保存期限为 12 个月。</p>																					

<b>自备试剂</b>	样品 RNA																																															
<b>使用方法</b>	<p><b>一、样品 RNA 的制备</b></p> <p>1. 如果有 N 个样品，必须设置 N+2 个提取反应，多出的两个中一个是 PC (样品制备阳性对照)，一个是 NC (样品制备阴性对照)。可以用 10<math>\mu</math>L 试剂盒提供的 RT-PCR 阳性对照 (1<math>\times</math>10E4 拷贝/<math>\mu</math>L) 再加上一定量的水作为核酸纯化的阳性对照 (加水后其总体积跟核酸纯化试剂盒所需要的起始样品体积相同)。可以用水作为制备的阴性对照。</p> <p>2. 用自选方法纯化上述 N+2 个样品的 RNA。本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容，也可以选用本公司的相关的核酸提取试剂盒或免核酸提取释放剂。</p> <p><b>二、设置 RT-PCR 反应 (20<math>\mu</math>L 体系)</b></p> <p>3. 标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 RNA 样品，额外增加的两个管一个用于 RT-PCR 阳性对照，另一个用于 RT-PCR 阴性对照。按照下表在各 PCR 管中加入下列成分：</p> <table border="1" data-bbox="472 1043 1453 1543"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>N+2 个样品管</th> <th>RT-PCR 阴性对照</th> <th>RT-PCR 阳性对照</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5<math>\times</math>双酶一管式 RT-PCR Buffer</td> <td>各 4 <math>\mu</math>L</td> <td>4 <math>\mu</math>L</td> <td>4 <math>\mu</math>L</td> </tr> <tr> <td>传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 引物混合液</td> <td>各 2 <math>\mu</math>L</td> <td>2 <math>\mu</math>L</td> <td>2 <math>\mu</math>L</td> </tr> <tr> <td>制备的 N+2 个 RNA 样品</td> <td>各 12.5 <math>\mu</math>L</td> <td>不加</td> <td>不加</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>不加</td> <td>12.5 <math>\mu</math>L</td> <td>不加</td> </tr> <tr> <td>传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 阳性对照 (1<math>\times</math>10E4 拷贝/<math>\mu</math>L)</td> <td>不加</td> <td>不加</td> <td>12.5 <math>\mu</math>L</td> </tr> <tr> <td>MMLV-Taq Mix</td> <td>1.5 <math>\mu</math>L</td> <td>1.5 <math>\mu</math>L</td> <td>1.5 <math>\mu</math>L</td> </tr> </tbody> </table> <p>4. 上机进行 RT-PCR，RT-PCR 反应参数为：</p> <table border="1" data-bbox="679 1603 1246 2051"> <thead> <tr> <th>过程</th> <th>温度</th> <th>时间</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>逆转录</td> <td>42<math>^{\circ}</math>C</td> <td>55 分钟</td> </tr> <tr> <td>预变性</td> <td>95<math>^{\circ}</math>C</td> <td>5 分钟</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">PCR 反应 (30 个循环)</td> <td>95<math>^{\circ}</math>C</td> <td>15 秒</td> </tr> <tr> <td>55<math>^{\circ}</math>C</td> <td>60 秒</td> </tr> <tr> <td>65<math>^{\circ}</math>C</td> <td>60 秒</td> </tr> <tr> <td>延伸</td> <td>72<math>^{\circ}</math>C</td> <td>10 分钟</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>三、电泳分析</b></p>	成份	N+2 个样品管	RT-PCR 阴性对照	RT-PCR 阳性对照	5 $\times$ 双酶一管式 RT-PCR Buffer	各 4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 引物混合液	各 2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	制备的 N+2 个 RNA 样品	各 12.5 $\mu$ L	不加	不加	超纯水	不加	12.5 $\mu$ L	不加	传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ $\mu$ L)	不加	不加	12.5 $\mu$ L	MMLV-Taq Mix	1.5 $\mu$ L	1.5 $\mu$ L	1.5 $\mu$ L	过程	温度	时间	逆转录	42 $^{\circ}$ C	55 分钟	预变性	95 $^{\circ}$ C	5 分钟	PCR 反应 (30 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15 秒	55 $^{\circ}$ C	60 秒	65 $^{\circ}$ C	60 秒	延伸	72 $^{\circ}$ C	10 分钟
成份	N+2 个样品管	RT-PCR 阴性对照	RT-PCR 阳性对照																																													
5 $\times$ 双酶一管式 RT-PCR Buffer	各 4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L																																													
传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 引物混合液	各 2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L																																													
制备的 N+2 个 RNA 样品	各 12.5 $\mu$ L	不加	不加																																													
超纯水	不加	12.5 $\mu$ L	不加																																													
传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ $\mu$ L)	不加	不加	12.5 $\mu$ L																																													
MMLV-Taq Mix	1.5 $\mu$ L	1.5 $\mu$ L	1.5 $\mu$ L																																													
过程	温度	时间																																														
逆转录	42 $^{\circ}$ C	55 分钟																																														
预变性	95 $^{\circ}$ C	5 分钟																																														
PCR 反应 (30 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15 秒																																														
	55 $^{\circ}$ C	60 秒																																														
	65 $^{\circ}$ C	60 秒																																														
延伸	72 $^{\circ}$ C	10 分钟																																														

	<ol style="list-style-type: none"> <li>5. 取 10<math>\mu</math>L 扩增产物进行常规琼脂糖电泳,检测扩增效果,由于扩增产物较短,建议用 1.5%-2.0%的琼脂糖凝胶。</li> <li>6. 阳性样品预期得到的扩增产物长度为 165bp。如果两个阴性对照(样品制备阴性对照或 RT-PCR 阴性对照)有此扩增产物,说明环境污染,则整个实验无效,不需要分析实验结果。</li> <li>7. 如果所有样品和 RT-PCR 阳性对照均无此扩增产物,则说明有系统性的问题(试剂,设备,程序,操作等),需要重复并排查原因。</li> <li>8. 如果没有上述两种情况,则实验有效,可以分析样品的扩增结果。N+2 个样品中扩增产物的判断为阳性,无则判定为阴性。</li> </ol>
<p><b>关联产品</b></p>	<p>传染性胰脏坏死病病毒荧光及可视化 RT-LAMP 检测试剂盒</p>