|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:14-26420****低温运输，-20℃保存** |  |
| **猪巨细胞病毒染料法qPCR试剂盒****Porcine Cytomegavirus SYBR qPCR 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** |
| **产品及特点** | 猪巨细胞病毒（Porcine Cytomegavirus，PCMV）属于β-疱疹病毒科，引起[猪巨细胞病毒感染症](https://baike.baidu.com/item/%E7%8C%AA%E5%B7%A8%E7%BB%86%E8%83%9E%E7%97%85%E6%AF%92%E6%84%9F%E6%9F%93%E7%97%87)又称包涵体鼻炎，主要侵害猪的鼻甲黏膜黏液腺、[泪腺](https://baike.baidu.com/item/%E6%B3%AA%E8%85%BA)、唾液腺及肾小管上皮，种猪感染后可引起胚胎和子猪发育不良，子[猪鼻炎](https://baike.baidu.com/item/%E7%8C%AA%E9%BC%BB%E7%82%8E)、肺炎以及增重缓慢等。感染猪后感染细胞体积是正常细胞的6倍。猪巨细胞病毒有宿主的特异性，不能在兔、鼠、鸡胚和牛体内复制，只有在猪体内复制，在已经分离出的毒株中，没有证明有血清学变异。由于猪巨细胞病毒危害巨大，因此对其进行快速准确的诊断具有重要意义。本产品就是为此目的开发的专门检测猪巨细胞病毒的荧光定量PCR试剂盒，它具有下列特点：1. 即开即用，用户只需要提供样品DNA模板。
2. 引物经过优化，灵敏性高，分析灵敏度可以达到100拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据猪巨细胞病毒高度保守区设计，不会跟其他生物的DNA发生交叉反应。
5. 本产品足够50次20μL体系的染料法荧光定量PCR反应。
6. 既可用于定性，也可用于定量。用于定量时线性范围至少5个数量级。
7. 本产品只能用于科研。
 |
| **规格及成分** |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 成分 | 编号 | 规格 |
| 2×SYBR qPCR MagicMix | 90408 | 0.5 mL（本色盖） |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 180701 | 1 mL（绿盖管） |
| 超纯水 | 210806 | 1 mL（蓝盖管） |
| 猪巨细胞病毒染料法qPCR引物混合液 | yw15-26420va | 100 μL（白盖管） |
| 猪巨细胞病毒PCR阳性对照 (1×10E7拷贝/μL) | pd15-26420va | 50 μL（黄盖管） |
| 使用手册 | 14-26420sc | 1份 |

 |
| **运输及保存** | 低温运输，-20℃保存，保存期限为12个月。 |
| **自备试剂** | 样品DNA。 |
| **使用方法** | **一、稀释标准曲线样品**（以10E1-10E6拷贝/μL这6个10倍稀释度为例）。由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分）。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供无传染性的DNA片段作为阳性对照。1. 标记6个离心管，分别为6，5，4，3，2，1。
2. 用带芯枪头分别加入45 μL荧光PCR专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。
3. 在6号管中加入5 μL 1×10E7拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得1×10E6拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在5号管中加入5 μL 1×10E6拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E5拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在4号管中加入5 μL 1×10E5拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E4拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到6个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

**二、样品DNA的制备**1. 如果有N个样品，最好设置N+2个提取，多出的一个是PC（样品制备阳性对照），一个是NC（样品制备阴性对照）。可以用10μL第6步所得的第4号稀释液（1×10E4拷贝/μL）再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为PC。另外用水作为NC。
2. 用自选方法纯化样品的DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品DNA提取试剂盒兼容，也可使用本公司的免提取核酸释放剂。

**三、染料法qPCR反应（20μL体系，在样品制备室进行）**1. 如果做定量分析并且只做1次重复，则标记N+9个PCR管，其中N+2个用于上步得到的N+2个样品，1个用于PCR阴性对照（用水做模板），6个用于标准曲线。如果做定性分析，并且只做1次重复，则标记N+4个PCR管，其中N+2个用于上步得到的N+2个样品，1个用于PCR阴性对照（用水做模板），1个用于PCR阳性对照（用第6步第4号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
2. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后最后加）：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **成分** | **样品管****N+2个** | **PCR阴性对照管** | **标准曲线****样品管（1-6管）** |
| 2×SYBR qPCR MagicMix | 10 μL | 10 μL | 各10 μL |
| 猪巨细胞病毒染料法qPCR引物混合液 | 2 μL | 2 μL | 各2 μL |
|  N+2个待测DNA模板 | 8 μL | 不加 | 不加 |
| 超纯水 | 不加 | 8 μL | 不加 |
| 第6步所得标准曲线样品稀释液（1-6号） | 不加 | 不加 | 各8μL（2号样到2号管，3号样到3号管…） |

1. 盖上盖子后上机，按下面参数进行PCR：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **过程** | **温度** | **时间** |
| 预变性 | 95℃ | 5 分 |
| PCR反应（35个循环） | 95℃ | 10秒 |
| 60℃ | 40秒（采集SYBR通道的荧光信号） |

注意：循环次数不要超过35个循环。**五、数据处理**1. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有Ct值，但Tm值跟阳性对照Tm不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，数据无效，不予以分析。Tm跟阳性对照Tm一致的，为有效Ct。
2. 如果两种阴性对照的溶解曲线所得Tm值跟阳性对照的Tm值一样，说明环境或试剂可能有过去的PCR扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。
3. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和PCR阴性对照）扩增产品的Tm跟阳性样品的Tm不同，则判为假阳性，这种情况下，实验有效，可以继续分析其它样品有效数据。
4. 对定量检测，以阳性对照样品的浓度的log值为横轴，以有效Ct值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效Ct值从标准曲线上推算出样品DNA浓度的log值，再换算出待测样品的DNA浓度。
5. 对定性检测，具有有效Ct值的样品为阳性，没有有效Ct值的样品为阴性。
 |
| **关联产品** | 猪巨细胞病毒荧光及可视化LAMP检测试剂盒 |

20220324dx