

天
净
沙
系
列

CAT#:15-14000
低温运输, -20℃保存

BINGENE

犬瘟热病毒探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒
Canine Distemper Virus Probe 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; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	<p>犬瘟热病毒（Canine Distemper Virus, CDV）属于副粘病毒科、麻疹病毒属，是一种单链 RNA 病毒，主要侵犯狗科、鼬科动物，能够引起犬瘟热病。该病引起的一种高度接触性传染病，传染性强，。犬瘟热症状初期狗发高热，食欲不振，精神沉郁，眼鼻流出水样分泌物，打喷嚏，有腹泻。在以后 2-14 天内再次出现体温升高，咳嗽，有脓性鼻涕、脓性眼屎这时候已经是犬瘟中期了。同时继发胃肠道疾病，呕吐、拉稀，食欲废绝。精神高度沉郁，嗜睡。犬瘟热发病后期就会出现典型的神经症状，口吐白沫，抽搐，死亡率可高达 80%以上，因此快速灵敏诊断犬瘟热病毒具有重要意义。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犬瘟热病毒的试剂盒，它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none">1. 即开即用，用户只需要提供样品 RNA 模板。2. 引物和探针经过优化，灵敏性高，可以达到 100 拷贝/μL。3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。4. 特异性高，引物是根据犬瘟热病毒高度保守区设计，不会跟其他病毒的 RNA 发生交叉反应。5. 本产品既可用于定性检测，也可用于定量检测，用于定量检测时线性范围至少有 5 个数量级。6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 RT-PCR 反应。7. 本产品只能用于科研。		
规格及成分	成分	编号	五孔盒包装
	探针法 qRT-PCR 缓冲液	190504a	500μL（蓝盖管）
	探针法 qRT-PCR 酶混合液	190504b	100μL（红盖管）
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL（绿盖管）
	犬瘟热病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	yp15-14000	150μL（棕色管）
	犬瘟热病毒 qRT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc14000	50μL（黄盖管）
	使用手册	15-14000sc	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 RNA。		

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以 $10E1$ - $10E6$ 拷贝/ μ L 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。如果需要 RNA 阳性样品，需要另外订购。

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 μ L 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 μ L $1 \times 10E7$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E6$ 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μ L $1 \times 10E6$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E5$ 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μ L $1 \times 10E5$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E4$ 拷贝/ μ L 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 RNA 的制备

7. 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 10 μ L 上步所得 4 号稀释液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。
8. 用自选方法纯化样品的 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容，也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qRT-PCR 反应（20 μ L 体系，在样品制备室进行）

9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 个 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-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 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 RT-PCR 阳性对照（直接用第 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。
10. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一重复。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	RT-PCR 阴性对照 管	标准曲线 样品管 (1-6 管)
		探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
		探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 μL	2 μL	2 μL
		犬瘟热病毒 RT-PCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
		待测样品 RNA 模板	各 5 μL	不加	不加
		超纯水	不加	5 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 5μL (2 号 样到 2 号管， 3 号样到 3 号 管…)
	11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 RT-PCR:				