

天
净
沙
系
列

CAT#:15-26420
低温运输, -20℃保存

BINGENE

猪巨细胞病毒探针法 qPCR 试剂盒

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	猪巨细胞病毒 (Porcine Cytomegalovirus, PCMV)猪巨细胞病毒是一种疱疹病毒,故又叫猪疱疹病 2 型。PCMV 在全世界几乎所有猪群,至少在大多数猪群当中都有存在,但多为亚临床感染,少见发病。PCMV 主要是侵害猪的呼吸道系统,会引起肺炎、流涕等症状。在新生仔猪会导致鼻炎,因此快速检测猪巨细胞病毒具有重要的意义。本产品就是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测猪巨细胞病毒的试剂盒,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. 引物和探针经过优化,分析灵敏性高,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,引物是根据猪巨细胞病毒 DNA 高度保守区设计,不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。 5. 既可用于定性检测,又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。 6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 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
	2 $\times$ Probe qPCR MagicMix	190303	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	100935	1 mL (蓝盖管)
	猪巨细胞病毒 qPCR 引物-探针混合液	yp15-26420va	150 μL (棕色管)
	猪巨细胞病毒 qPCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E7 拷贝/ μL)	pc26420 - AJ222640.1	50 μL (黄盖管)
	使用手册	15-26420sc	1 份
运输及保存	低温运输, -20 $^{\circ}\text{C}$ 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 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供),充分震荡 1 分钟,得 1×10^6 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 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1×10^5 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 1×10^5 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1×10^4 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

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 μL 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 DNA,本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 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 qPCR 反应 (20 μL 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 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(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	标准曲线样品管 (1-6 管)
2 $\times$ Probe qPCR MagicMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
猪巨细胞病毒 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加
超纯水	不加	7 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 7 μL (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 PCR: <table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>5 min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>95℃</td><td>15 sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号，设置 TAMRA 为淬灭基团)</td></tr></table> 五、数据处理 12. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。 13. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照必须无 Ct。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于或等于 35，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 则为阴性，如果 Ct 小于 35 则为阳性，如果在 35-40 之间，则重复一次。重复实验的 Ct 值如果小于 40，则为阳性，如果无 Ct 则判为阴性。	过程	温度	时间	预变性	95℃	5 min	PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec	60℃	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号，设置 TAMRA 为淬灭基团)
过程	温度	时间										
预变性	95℃	5 min										
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec										
	60℃	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号，设置 TAMRA 为淬灭基团)										
关联产品	猪巨细胞病毒荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒											