

天净沙系列

CAT#:15-30900  
低温运输, -20℃保存

**BINGENE**

**细小病毒 B19 探针法 qPCR 试剂盒**  
**Parvovirus B19 Probe 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: 400-6605850; 电邮: [order@bingene.com](mailto:order@bingene.com)

<b>产品及特点</b>	<p>细小病毒 B19(Parvovirus B19) 是英国科学家 Cossart 及其同事于 1977 年在筛查无症状乙肝患者血清时无意发现的，由于其是在 B 组的第 19 号样品中发现的，故命名为 B19 病毒。该病毒只在人类及少部分猴类传染，属人类专有病毒。其病毒颗粒直径为 23nm，无囊膜包裹，基因组是由 3500bp 的单链 DNA，末端回文序列长达 365 个碱基，G、C 含量高，使得 B19 病毒二级结构牢固，而不易克隆入细菌中。病毒颗粒对热稳定，56℃30 分钟仍可存活。该病毒可引起的典型疾病是传染性红斑和急性关节病，在妊娠妇女可引起胎儿水肿乃至死胎，因此快速灵敏检测细小病毒 B19 有重要意义。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细小病毒 B19 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 DNA 模板。</li> <li>2. 引物和探针经过优化，灵敏性高，能达到 100 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，引物是根据细小病毒 B19 高度保守区设计，不会跟其他病毒的 DNA 发生交叉反应。</li> <li>5. 本产品既可用于定性，又可用于定量，用于定量时其线性范围至少有 5 个数量级。</li> <li>6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。</li> <li>7. 本产品只能用于科研。</li> </ol>																					
<b>规格及成分</b>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">成分</th><th style="text-align: center;">编号</th><th style="text-align: center;">五孔盒包装</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">2 × Probe qPCR MasterMix</td><td style="text-align: center;">981201</td><td style="text-align: center;">500μL (本色盖)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td style="text-align: center;">180701</td><td style="text-align: center;">1mL (绿盖管)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">超纯水</td><td style="text-align: center;">210806</td><td style="text-align: center;">1mL (蓝盖管)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">细小病毒 B19 探针法 qPCR 引物-探针混合液</td><td style="text-align: center;">yp15-30900</td><td style="text-align: center;">150μL (白盖管)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">细小病毒 B19 探针法 qPCR 阳性对照(<math>1 \times 10^7</math> 拷贝 / μL)</td><td style="text-align: center;">pc30900</td><td style="text-align: center;">50μL (黄盖管)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">使用手册</td><td style="text-align: center;">15-30900sc</td><td style="text-align: center;">1 份</td></tr> </tbody> </table>	成分	编号	五孔盒包装	2 × Probe qPCR MasterMix	981201	500μL (本色盖)	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL (绿盖管)	超纯水	210806	1mL (蓝盖管)	细小病毒 B19 探针法 qPCR 引物-探针混合液	yp15-30900	150μL (白盖管)	细小病毒 B19 探针法 qPCR 阳性对照( $1 \times 10^7$ 拷贝 / μL)	pc30900	50μL (黄盖管)	使用手册	15-30900sc	1 份
成分	编号	五孔盒包装																				
2 × Probe qPCR MasterMix	981201	500μL (本色盖)																				
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL (绿盖管)																				
超纯水	210806	1mL (蓝盖管)																				
细小病毒 B19 探针法 qPCR 引物-探针混合液	yp15-30900	150μL (白盖管)																				
细小病毒 B19 探针法 qPCR 阳性对照( $1 \times 10^7$ 拷贝 / μL)	pc30900	50μL (黄盖管)																				
使用手册	15-30900sc	1 份																				
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。																					
<b>自备试剂</b>	样品 DNA。																					

## 使用方法

### 一、稀释标准曲线样品（以 10E1-10E6 拷贝 / $\mu\text{L}$ 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。

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 $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$   $1 \times 10\text{E}7$  拷贝 / $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10\text{E}6$  拷贝 / $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 $\mu\text{L}$   $1 \times 10\text{E}6$  拷贝 / $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10\text{E}5$  拷贝 / $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 $\mu\text{L}$   $1 \times 10\text{E}5$  拷贝 / $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10\text{E}4$  拷贝 / $\mu\text{L}$  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 DNA 的制备

7. 如果有 N 个样品待提取，最好设置 N+2 个提取，多出的是 PC (样品制备阳性对照) 和 NC (样品制备阴性对照)。可以取阳性对照的 10000 倍稀释液 10 $\mu\text{L}$  再加上一定量的水，使总体积与待提取样品的规定体积一致，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 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的相关产品或酶提取核酸释放剂。

### 三、Probe qPCR 反应 (20 $\mu\text{L}$ 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 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 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	PCR 阴性	标准曲线
----	-----	--------	------

		N+2 个	对照管	样品管 (1-6 管)
2 × Probe qPCR MagicMix		10μL	10μL	各 10μL
细小病毒 B19 探针法 qPCR 引物-探针混合液		3μL	3μL	各 3μL
N+2 个待测 DNA 模板		7μL	-	-
超纯水		-	7μL	-
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)		-	-	各 7μL (1 号样到 1 号管, 2 号样到 2 号管...)

11. 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 min
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15sec
	60℃	60sec (采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA)

#### 四、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 RNA 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 Ct 值必须大于等于 40 或为零。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 40。对待测样品，如果其 Ct 大于等于 40 或为零则为阴性，如果小于 40 则为阳性。

#### 关联产品

细小病毒 B19 探针法荧光定量 PCR 试剂盒