

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)

产品及特点	<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> <p>1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板。</p> <p>2. 引物和探针经过优化，灵敏性高，能达到 100 拷贝/反应。</p> <p>3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。</p> <p>7. 本产品只能用于科研。</p>		
规格及成分	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(1×10E7 拷贝/μL)	pc30900	50μL（黄盖管）
	使用手册	15-30900sc	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 45μL 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 5μL 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 5μL 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 5μL 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**
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 10μL 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面提取核酸释放剂。
- 三、Probe qPCR 反应（20μL 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：													
<table><tr><td>过程</td><td>温度</td><td>时间</td></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>15sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60sec（采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA）</td></tr></table>				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）
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													