

天
净
沙
系
列

CAT#:15-33100
低温运输, -20℃保存

BINGENE

山羊痘病毒探针法 qPCR 试剂盒

GPV 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; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	山羊痘病毒(Goat Pox Virus, GPV) 属于痘病毒科, 羊痘病毒属的一个成员, 引起山羊痘(Goat Pox)。山羊痘病毒耐干燥, 可在干燥状态下存活几个月, 冻融对其没有明显的灭活作用, 但对乙醚敏感。羊痘易传播, 被怀疑可通过空气悬浮颗粒和昆虫媒介传播。其引起的山羊痘是山羊的一种病毒性疾病, 以体温升高、全身性丘疹或结节、水泡(少数)、内脏病变(特别是肺脏)乃至死亡为特征。世界动物卫生组织(OIE)将该病列为 A 类疾病, 我国农业部将山羊痘列为国家一类动物疫病。临床上也有人感染的病例, 是一种人畜共患病。因此快速检测山羊痘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山羊痘病毒的试剂盒, 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, 引物是根据山羊痘病毒 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	<table><tr><th>成分</th><th>编号</th><th>五孔盒包装</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MagicMix</td><td>190303</td><td>5 00uL (本色盖)</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>180701</td><td>1 mL (绿盖管)</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>210806</td><td>1 mL (蓝盖管)</td></tr><tr><td>山羊痘病毒 qPCR 引物-探针混合液</td><td>yp15-33100yj</td><td>150 μL (棕色管)</td></tr><tr><td>山羊痘病毒 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)</td><td>pd33100yj</td><td>50 μL (黄盖管)</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>15-33100sc</td><td>1 份</td></tr></table>	成分	编号	五孔盒包装	2×Probe qPCR MagicMix	190303	5 00uL (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)	山羊痘病毒 qPCR 引物-探针混合液	yp15-33100yj	150 μL (棕色管)	山羊痘病毒 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pd33100yj	50 μL (黄盖管)	使用手册	15-33100sc	1 份		
成分	编号	五孔盒包装																						
2×Probe qPCR MagicMix	190303	5 00uL (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)																						
山羊痘病毒 qPCR 引物-探针混合液	yp15-33100yj	150 μL (棕色管)																						
山羊痘病毒 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pd33100yj	50 μL (黄盖管)																						
使用手册	15-33100sc	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

- 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 10μL 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（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（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	PCR 阴性	标准曲线样品管
----	-----	--------	---------

	N+2 个	对照	(1-6 管)
2×Probe qPCR MagicMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
山羊痘病毒 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 7μL (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:

过程	温度	时间
预变性	95℃	3 min
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec
	60℃	30 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 设置 BHQ1 为淬灭基团)

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 或者大于或等于 40。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, 否则实验无效。如果实验有效, 则分析待测样品, 如果无 Ct 或者大于或等于 40 则为阴性, 如果 Ct 小于 40 则为阳性。

关联产品

山羊痘病毒荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒