

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:15-42500  
低温运输, -20℃保存

**BINGENE**

猪圆环病毒探针法 qPCR 试剂盒

Porcine Circovirus Probe 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](http://www.bingene.com); 电话: 400-6605850; 电邮: [order@bingene.com](mailto:order@bingene.com)

| 产品及特点                         | <p>猪圆环病毒（Porcine Circovirus, PCV）是圆环病毒科、圆环病毒属的一种无囊膜环状单链 DNA 病毒，也是迄今为止发现的具有自主复制能力的最小的动物病毒。目前，已经鉴定出四种 PCV，包括 PCV1、PCV2、PCV3 和 PCV4。在病猪鼻黏膜、支气管、肺脏、扁桃体、肾脏、脾脏和小肠中有 PCV 粒子存在。胸腺、脾、肠系膜、支气管等处的淋巴组织中均有该病毒，其中肺脏及淋巴结中检出率较高。表明 PCV 严重侵害猪的免疫系统：病毒与巨噬细胞/单核细胞、组织细胞和胸腺巨噬细胞相伴随，导致患猪体况下降，形成免疫抑制，从而造成猪产生多种疾病，给世界养猪业造成了巨大的损失。因此快速灵敏诊断猪圆环病毒具有重要意义。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猪圆环病毒的试剂盒，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，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/μL。</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，引物是根据猪圆环病毒 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。</p> <p>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。</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                         | <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>0.5 mL（本色盖）</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>180701</td><td>1 mL（黄盖）</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>100935</td><td>1 mL（蓝盖）</td></tr><tr><td>猪圆环病毒通用 qPCR 引物-探针混合液</td><td>yp15-42500</td><td>150 μL（白盖）</td></tr><tr><td>猪圆环病毒 qPCR 阳性对照（1×10E7 拷贝/μL）</td><td>pd42510</td><td>50 μL（红盖）</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>15-42500sc</td><td>1 份</td></tr></table>                                                                                                                                                                                            | 成分          | 编号 | 五孔盒包装 | 2×Probe qPCR MagicMix | 190303 | 0.5 mL（本色盖） | 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 180701 | 1 mL（黄盖） | 超纯水 | 100935 | 1 mL（蓝盖） | 猪圆环病毒通用 qPCR 引物-探针混合液 | yp15-42500 | 150 μL（白盖） | 猪圆环病毒 qPCR 阳性对照（1×10E7 拷贝/μL） | pd42510 | 50 μL（红盖） | 使用手册 | 15-42500sc | 1 份 |  |  |
| 成分                            | 编号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 五孔盒包装       |    |       |                       |        |             |                |        |          |     |        |          |                       |            |            |                               |         |           |      |            |     |  |  |
| 2×Probe qPCR MagicMix         | 190303                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 0.5 mL（本色盖） |    |       |                       |        |             |                |        |          |     |        |          |                       |            |            |                               |         |           |      |            |     |  |  |
| 荧光 PCR 专用模板稀释液                | 180701                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1 mL（黄盖）    |    |       |                       |        |             |                |        |          |     |        |          |                       |            |            |                               |         |           |      |            |     |  |  |
| 超纯水                           | 100935                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1 mL（蓝盖）    |    |       |                       |        |             |                |        |          |     |        |          |                       |            |            |                               |         |           |      |            |     |  |  |
| 猪圆环病毒通用 qPCR 引物-探针混合液         | yp15-42500                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 150 μL（白盖）  |    |       |                       |        |             |                |        |          |     |        |          |                       |            |            |                               |         |           |      |            |     |  |  |
| 猪圆环病毒 qPCR 阳性对照（1×10E7 拷贝/μL） | pd42510                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 50 μL（红盖）   |    |       |                       |        |             |                |        |          |     |        |          |                       |            |            |                               |         |           |      |            |     |  |  |
| 使用手册                          | 15-42500sc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 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                         |    |    |     |     |        |                    |     |       |     |                        |
|                                                                                                                                                                                                                                          | 猪圆环病毒通用 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: |                        |       |                                 |    |    |     |     |        |                    |     |       |     |                        |
| <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>30 sec</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应<br/>(45 个循环)</td><td>95℃</td><td>5 sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>1 min (采集 FAM 通道的荧光信号)</td></tr></table> |                           |                        |       | 过程                              | 温度 | 时间 | 预变性 | 95℃ | 30 sec | PCR 反应<br>(45 个循环) | 95℃ | 5 sec | 60℃ | 1 min (采集 FAM 通道的荧光信号) |
| 过程                                                                                                                                                                                                                                       | 温度                        | 时间                     |       |                                 |    |    |     |     |        |                    |     |       |     |                        |
| 预变性                                                                                                                                                                                                                                      | 95℃                       | 30 sec                 |       |                                 |    |    |     |     |        |                    |     |       |     |                        |
| PCR 反应<br>(45 个循环)                                                                                                                                                                                                                       | 95℃                       | 5 sec                  |       |                                 |    |    |     |     |        |                    |     |       |     |                        |
|                                                                                                                                                                                                                                          | 60℃                       | 1 min (采集 FAM 通道的荧光信号) |       |                                 |    |    |     |     |        |                    |     |       |     |                        |
| 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 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长, 有典型扩增曲线, Ct 值应该小于或等于 35。对待测样品, 如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性, 如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间, 则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性, 如果小于 40, 则为阳性。                                       |                           |                        |       |                                 |    |    |     |     |        |                    |     |       |     |                        |
| 关联产品                                                                                                                                                                                                                                     | 猪圆环病毒荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒    |                        |       |                                 |    |    |     |     |        |                    |     |       |     |                        |