

天
净
沙
系
列

CAT#:15-42551
低温运输, -20℃保存

BINGENE

鸭圆环病毒探针法 qPCR 试剂盒

Duck Circovirus (DuCV) Probe PCR Kit

使用手册 V1.0

北京克必隆分子诊断技术有限公司

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

产品及特点	鸭圆环病毒可感染各种鸭种，感染后使鸭羽凌乱，呼吸困难，贫血，生长迟缓，体重下降，甚至零星死亡。鸭圆环病毒还会损害鸭子的免疫系统，导致鸭子的免疫功能下降和免疫抑制，鸭子群容易受到其他疾病的侵袭，或者继发感染鸭子的病毒性肝炎、鸭子疫情中的默氏杆菌病和大肠杆菌病等疾病。因此快速灵敏检测鸭圆环病毒具有重要意义。本产品就是为此目的根据 PCR 原理开发的试剂盒，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，引物是根据鸭圆环病毒 DNA 高度保守区设计，不会跟其他的 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×Probe qPCR MagicMix	190303	500μL（本色盖）
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL（红盖）
	超纯水	100935	1mL（紫盖）
	鸭圆环病毒 qPCR 引物-探针混合液	yp15-42551	150μL（棕色管）
	鸭圆环病毒 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc42551	50μL（黄盖）
	使用手册	15-42551sc	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, 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 N+2 个	PCR 阴性 对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
2×Probe qPCR MagicMix	各 10μL	10μL	各 10μL
鸭圆环病毒 qPCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7μL	不加	不加
超纯水	不加	7μL	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 (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><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>1 min (采集 FAM 通道的荧光信号)</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 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。	过程	温度	时间	预变性	95℃	5 min	PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec	60℃	1 min (采集 FAM 通道的荧光信号)
过程	温度	时间										
预变性	95℃	5 min										
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec										
	60℃	1 min (采集 FAM 通道的荧光信号)										
关联产品	鸭圆环病毒探针法荧光定量 PCR 检测试剂盒											