

天
净
沙
系
列

CAT#:15-43600

低温运输, -20℃保存

BINGENE

羊边界病病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒

Border Disease Virus(BDV) Probe qRT-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	羊边界病病毒(BorderDiseaseVirus，BDV)会引起羊边界病，是新生羔羊以身体多毛、生长不良和神经异常为主要特征的一种先天性传染病。边界病病毒的临诊表现主要取决于宿主的年龄。临诊疾病限于在怀孕期受到感染的新生或年幼羔羊。如一个羊群受到感染时，主要表现在繁殖季节不孕或流产增多，流产可发生于怀孕的任何时期，但以怀孕后 90 天左右为最多。由于胎儿的严重畸型导致脊柱后侧凸或关节变曲而表现为难产。边界病病毒呈世界性分布，大多数饲养绵羊国家都有本病的报道，因此灵敏快捷的诊断产品具有重要的意义。本产品以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测羊边界病病毒的试剂盒，它具有下列特点： 1. 即开即用，用户只需要提供样品 RNA 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，引物是根据羊边界病病毒 RNA 高度保守区设计，不会跟其他的 RNA 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 各数量级。 6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法 qRT-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
	探针法 qRT-PCR 缓冲液	190504a	500μL（蓝盖）
	探针法 qRT-PCR 酶混合液	190504b	100μL（红盖）
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL（绿盖）
	羊边界病病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	yp15-43600	150μL（棕色管）
	羊边界病病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc43600	50μL（黄盖）
	使用手册	15-43600sc	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 RNA。		

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以 $10E1$ - $10E6$ 拷贝/ μ 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。如果需要 RNA 阳性样品，需要另外订购。

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 45μ 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 5μ L $1\times 10E7$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 $1\times 10E6$ 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5μ L $1\times 10E6$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1\times 10E5$ 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5μ L $1\times 10E5$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1\times 10E4$ 拷贝/ μ 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 RNA 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 10μ L 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 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 RNA 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 qRT-PCR 反应（ 20μ 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 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-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 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 RT-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	RT-PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)													
	探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10μL	10μL	各 10μL													
	探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2μL	2μL	各 2μL													
	羊边界病病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL													
	N+2 个待测 RNA 样本	各 5μL	不加	不加													
	超纯水	不加	5μL	不加													
	第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 5μL (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 RT-PCR:																
<table><tr><td>过程</td><td>温度</td><td>时间</td></tr><tr><td>逆转录</td><td>50℃</td><td>30 min</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>15 sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号)</td></tr></table>				过程	温度	时间	逆转录	50℃	30 min	预变性	95℃	5 min	PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec	60℃	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号)
过程	温度	时间															
逆转录	50℃	30 min															
预变性	95℃	5 min															
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec															
	60℃	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号)															
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 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	羊边界病病毒探针法荧光定量 PCR 检测试剂盒																