

天
净
沙
系
列

CAT#:15-91100
低温运输, -20℃保存

BINGENE

猪瘟兔化弱毒疫苗病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒
HCLV Probe qRT-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; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	猪瘟疫化弱毒疫苗病毒（Lapinized Chinese Strain of Classical Swine Fever Virus、LCCSFV, 又叫 Hog Cholera Lapinized Vaccine Virus、HCLV）是将猪瘟种毒通过兔传代致弱而成，具备安全性好，免疫性强等特点。注苗 72 小时即可获得免疫力，在疫区紧急接种，可以迅速控制猪瘟流行，因此快速灵敏诊断猪瘟疫化弱毒疫苗病毒具有重要意义。本产品就是以探针法 qRT-PCR 技术为基础开发的专门检测猪瘟疫化弱毒疫苗的试剂盒，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，引物是根据猪瘟疫化弱毒疫苗病毒 RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 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	500 μL（蓝盖管）
	探针法 qRT-PCR 酶混合液	190504b	100 μL（红盖管）
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL（绿盖管）
	猪瘟疫化弱毒疫苗病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	yp15-91100xj	150 μL（棕色管）
	猪瘟疫化弱毒疫苗病毒 RT-PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	Pd15-91100xj	50 μL（黄盖管）
	使用手册	15-91100sc	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/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。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 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 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供),充分震荡 1 分钟,得 1×10^6 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 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1×10^5 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 1×10^5 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1×10^4 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 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 10 μL 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的起始体积一样,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 (20 μL 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	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 10 μL	10 μL	各 10 μL
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 μL	2 μL	各 2 μL
猪瘟兔化弱毒疫苗病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测 RNA 样本	各 5 μL	不加	不加
超纯水	不加	5 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 5μL (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 RT-PCR:			
	过程	温度	时间	
	逆转录	42℃	30 min	
	预变性	95℃	3 min	
	PCR 反应 (40 个循环)	95℃ 60℃	10 sec 60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, TAMRA 为淬灭基团)	
	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 35, 或者没有 Ct 值。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 35 则为阴性, 如果小于 35 则为阳性。			
关联产品	猪瘟兔化弱毒疫苗病毒荧光及可视化 RT-LAMP 检测试剂盒			