



# 猪托克特诺病毒 2 型探针法 qPCR 试剂盒

Torque Teno Sus Virus Type 2 Probe qPCR Kit

仅

供

科

研

使

用

<b>产品及特点</b>	<p>猪托克特诺病毒 2 型(Torque Teno Sus Virus Type 2, TTSuV-2) 也称为猪细环病毒 2 型，是一种单链的 DNA 病毒，广泛存在于猪群中的体内。它是一种可能与肝炎相关的输血病毒，该病毒的存在给养猪业带来了潜在的经济影响。因此快速检测猪托克特诺病毒 2 型具有重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测猪托克特诺病毒 2 型的试剂盒，<b>它具有下列特点：</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板</li> <li>2. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/反应。</li> <li>3. 提供阳性对照，便于制备标准曲线和用作扩增对照，排除假阴性结果。</li> <li>4. 含识别外源性内参的引物和探针，便于排除 PCR 假阴性样本。</li> <li>5. 特异性高，靶分子的引物和探针是根据猪托克特诺病毒 2 型 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。</li> <li>6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。</li> <li>7. 本产品足够 50 次 20 <math>\mu</math>L 体系的探针法 PCR 反应。</li> <li>8. 本产品只能用于科研。</li> </ol>																							
	<table border="1" data-bbox="355 1157 1571 1600"> <thead> <tr> <th>成分</th><th>规格</th><th>包装</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>500<math>\mu</math>L</td><td>0.5mL 本色管</td></tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>1mL</td><td>1.5mL 绿盖管</td></tr> <tr> <td>探针法 qPCR 特异性增强剂</td><td>50<math>\mu</math>L</td><td>0.5mL 蓝盖管</td></tr> <tr> <td>猪托克特诺病毒 2 型 PCR 引物-探针干粉(含内参引物探针)</td><td>50 次</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr> <tr> <td>猪托克特诺病毒 2 型 PCR 阳性对照(1E7 拷贝/<math>\mu</math>L)</td><td>50<math>\mu</math>L</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr> <tr> <td>外源性内参(1E4 拷贝/<math>\mu</math>L)</td><td>250<math>\mu</math>L</td><td>0.5mL 白盖管</td></tr> <tr> <td>使用手册</td><td>1 份</td><td>无</td></tr> </tbody> </table> <p data-bbox="812 1558 1095 1590">本产品采用五孔盒包装</p> <p data-bbox="372 1611 1538 1695"><b>注 意：</b>引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 220 <math>\mu</math>L 超纯水充分混匀后得到引物-探针混合液再使用，未用完的需要-20°C 保存。</p>	成分	规格	包装	2×Probe qPCR MasterMix	500 $\mu$ L	0.5mL 本色管	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管	探针法 qPCR 特异性增强剂	50 $\mu$ L	0.5mL 蓝盖管	猪托克特诺病毒 2 型 PCR 引物-探针干粉(含内参引物探针)	50 次	0.5mL 棕色管	猪托克特诺病毒 2 型 PCR 阳性对照(1E7 拷贝/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L	0.5mL 黄盖管	外源性内参(1E4 拷贝/ $\mu$ L)	250 $\mu$ L	0.5mL 白盖管	使用手册	1 份
成分	规格	包装																						
2×Probe qPCR MasterMix	500 $\mu$ L	0.5mL 本色管																						
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管																						
探针法 qPCR 特异性增强剂	50 $\mu$ L	0.5mL 蓝盖管																						
猪托克特诺病毒 2 型 PCR 引物-探针干粉(含内参引物探针)	50 次	0.5mL 棕色管																						
猪托克特诺病毒 2 型 PCR 阳性对照(1E7 拷贝/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L	0.5mL 黄盖管																						
外源性内参(1E4 拷贝/ $\mu$ L)	250 $\mu$ L	0.5mL 白盖管																						
使用手册	1 份	无																						
<b>使用方法</b>	<p><b>一、稀释标准曲线样品</b> (以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/<math>\mu</math>L 这 6 个 10 倍稀释度为例)。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 标记 6 个离心管，分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0。</li> <li>2. 在 0 号管中加入 280 <math>\mu</math>L 荧光 PCR 专用模板稀释液，35 <math>\mu</math>L 本试剂盒提供的外源性内参，震荡</li> </ol>																							

一分钟混匀。外源内参的浓度为 1111/ $\mu$ L。

3. 用带芯枪头分别将上步得到的混合液按 45  $\mu$ L/管加入到标记的 1-6 号管中, 用带芯枪头(下同)。
4. 在 6 号管中加入 5  $\mu$ L 1E7 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1E6 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 5 号管中加入 5  $\mu$ L 1E6 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E5 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 换枪头, 在 4 号管中加入 5  $\mu$ L 1E5 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E4 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
7. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线阳性样品, 各样品中外源内参浓度均为 1E3 拷贝/ $\mu$ L。放冰上待用。如需降低外源内参浓度, 可在第 2 步时减少加入量。

## 二、样品 DNA 的制备

8. 如果有 N 个样品, 设置 N+2 个提取, 多出的一个是制备 PC (样品制备阳性对照), 一个是制备 NC (样品制备阴性对照)。可以用确认是阳性的样本作为阳性对照, 用确认是阴性的样本作为阴性对照。
9. 用自选方法纯化样品的 DNA, 本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容, 需要特别注意的是在加入裂解液裂解之后, 需要在每个样本中加入本试剂盒提供的外源性内参, 加入量取决于内源内参终浓度和纯化后样本的体积。如果需要内源内参的浓度为 1E3 拷贝/ $\mu$ L (需要跟标准品中内参的浓度保持一致), 纯化后的 DNA 体积是 100  $\mu$ L, 则加入 1E5 拷贝, 相当于 10  $\mu$ L 外源性内参(1E4 拷贝/ $\mu$ L)。纯化后的 DNA 体积是 200  $\mu$ L, 则加入 2E5 拷贝, 相当于 20  $\mu$ L 外源性内参(1E4 拷贝/ $\mu$ L)。

## 三、Probe qPCR 反应 (20 $\mu$ L 体系, 在样品制备室进行)

10. 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。

**11. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复）：**

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 MasterMix	各 10μL	10μL	各 10μL
猪托克特诺病毒 2 型 PCR 引物-探针混合液(含内参引物探针)	各 4μL	4μL	各 4μL
探针法 qPCR 特异性增强剂	各 1μL	1μL	1μL
N+2 个待测样	各 56μL	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 (含内参, 1-6 号)	不加	不加	各 5μL

**12. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：预变性 5 分钟，PCR (95°C15 秒, 56°C15 秒, 72°C 30 秒) 35 个循环，每次在 72°C 时采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA、MGB**

**四、数据处理**

**13. 阴性阳性判断：**没有 Ct 读数，或 Ct 大于 35 判为阴性结果。有 Ct 读数，Ct 值小于 35，荧光信号有对数增长，有典型扩增曲线判为阳性结果。每个样本需要对 FAM 通道和 Cy5 通道的结果分别进行判定，得到两个结果。

**14. 实验有效性判断：**如果扩增阳性对照或制备阳性对照 FAM 通道结果为阴性则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析原因，可能是操作、仪器和试剂三方面的原因，重做扩增或制备或跟仪器和试剂厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照 FAM 通道结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析失败原因，直到污染消除。如果阳性对照和阴性对照正常，则进入下一步分析样本的有效性。

	<p><b>15.</b> 样本有效性判断：如果样本 FAM 通道的结果为阳性，则无论内参 Cy5 通道的结果是阴性还是阳性，样本的结果均有效。如果样本结果为阴性，内参通 Cy5 道结果也为阴性，则此样品的阴性结果无效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。</p> <p><b>16.</b> 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，分别以阳性对照 FAM 通道和内参 Cy5 通道的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线为斜线，<math>r^2</math> 必须大于 0.95，内参 Cy5 通道读数的标准曲线为一条跟 X 轴平行的横线。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。</p> <p><b>17.</b> 如果用于定性实验，对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 没有读数、或 Ct 大于或等于 35 则均为阴性，如果小于 35 则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的待测样本，如果其对应的内参 Cy5 通道也为阴性，则 FAM 阴性结果无效，此样品需重测。</p>
<b>PCR 编号</b>	TW-E10261
<b>说明书</b>	1 份
<b>自备试剂</b>	样品 DNA
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20°C保存，有效期 2 年

**生产企业：上海通蔚实业有限公司**

**公司地址：上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603**

**公司电话：021-54845833**

上海通耐

技术支持: 15800441009