

## 猪瘟病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒

### Classical Swine Fever Virus Probe qRT-PCR Kit

仅

供

科

研

使

用

#### 产品及特点

猪瘟病毒(Classical Swine Fever Virus, CSFV)属于黄病毒科瘟病毒属，为正义单链 RNA 病毒，

基因组全长为 12.3 knt。猪瘟病毒的传染性和存活率比较高，在自然界中主要通过病猪的粪便、口腔、皮肤等部位进行传播。猪瘟病毒的主要作用是在猪体内破坏免疫系统，从而使猪机体无法抵御其他细菌或病毒的侵袭。猪瘟病毒对猪养殖业造成了巨大的经济损失。因此快速灵敏诊断猪瘟病毒具有重要意义。本产品就是以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测猪瘟病毒的含内参试剂盒，**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/反应。
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。
4. 含识别内源性内参的引物和探针，便于排除 RT-PCR 假阴性样本。
5. 特异性高，靶分子的引物和探针是根据猪瘟病毒 RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
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。
7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 RT-PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

**规格及成分**

成分	规格	包装
探针法 qRT-PCR 缓冲液	500μL	0.5mL 蓝盖管
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	50μL	0.5mL 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
猪瘟病毒 RT-PCR 引物-探针干粉 (含内参引物探针)	50 次	0.5mL 棕色管
猪瘟病毒 RT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	50μL	0.5mL 黄盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用五孔盒包装		
<p><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 μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。</p>		

**使用方法**

- 一、稀释标准曲线样品** (以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例)。
1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。
  2. 在各管中加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液。

3. 在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1\text{E}7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得  $1\text{E}6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1\text{E}6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1\text{E}5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 4 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1\text{E}5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1\text{E}4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  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阳性样品。放冰上待用。

## **二、样品 RNA 的制备**

7. 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。
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 $\mu\text{L}$ 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 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) :

成分	样品管 N+2 个	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 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	各 10 $\mu\text{L}$
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	各 1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$

猪瘟疫病毒 PCR 引物-探针混合液(含内参引物和探针)	各 4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	各 4 $\mu$ L
N+2 个待测样 (含内源性内参)	各 5 $\mu$ L	不加	不加
超纯水	不加	5 $\mu$ L	
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 5 $\mu$ L

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	50 $^{\circ}$ C	10min
预变性	95 $^{\circ}$ C	4min
RT-PCR 反应 (40 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15sec
	60 $^{\circ}$ C	45 sec (采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 BHQ)

#### 四、数据处理

12. 阴性阳性判断：没有 Ct 读数，或 Ct 大于 40 判为阴性结果。有 Ct 读数，Ct 值小于 40，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。

13. 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。

14. 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><b>15.</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，r2 必须大于 0.95，内参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 RNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。</p> <p><b>16.</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 40 则均为阴性，如果小于 40 则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的<b>待测样本，如果其对应的内参通道也为阴性，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。</b></p>
<b>PCR 编号</b>	TW-E10262
<b>说明书</b>	1 份
<b>自备试剂</b>	样品 RNA
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20℃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**

**技术支持: 15800441009**