

## 猪流行性腹泻病毒染料法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

咨询 QQ : [2881498726](https://www.qq.com)

订购热线 : [021 - 54720761](tel:021-54720761)

咨询电话 : [13166274233\(微信同号\)](https://www.qq.com)

### 产品及特点:

猪流行性腹泻(Porcine Epidemic Diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(PEDV)引起的一种急性、高度接触性肠道传染病,对养猪业的危害极大,所以及早确诊对该病的防治具有特别重要的意义。猪流行性腹泻病毒的传统诊断方法主要有病毒的分离鉴定、免疫荧光抗体试验、免疫电镜观察和 ELISA 等方法。但这些方法操作过程繁琐、操作难度大,所需要时间较长,专一性不强因此建立一种快速、高灵敏度的诊断方法对防治 PEDV 感染是十分必要的。本公司开发猪流行性腹泻病毒染料法荧光定量 PCR 试剂盒。

1. 一站式,用于不需要单独准备每种成分,包括引物和对照。
2. 根据猪流行性腹泻病毒的保守基因序列设计的引物,具有良好的特异性。
3. 基于染料法 qRT-PCR 检测,灵敏度比常规 RT-PCR 高 10-100 倍,可以达到至少 1000 拷贝/反应。
4. 使用一管式 qRT-PCR 技术,RT 和 PCR 两步在一个试管内完成,不需要中间转移样品,降低了操作误差和可能的污染。
5. 本产品足够 50 次 30 $\mu$ L 体系的 RT-PCR。

### 规格及成分:

编号	成分	规格
试剂一	2 $\times$ qRT-PCR 缓冲液	500 $\mu$ L (棕色管)

试剂二	10×qRT-PCR 酶混合液	100 μL (红盖)
试剂三	ROX 染料 I, 50×	20 μL (棕色管)
试剂四	ROX 染料 II, 50×	20 μL (棕色管)
试剂五	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL (黄盖)
试剂六	猪流行性腹泻病毒染料法 qRT-PCR 引物混合液	100 μL (白盖)
试剂七	猪流行性腹泻病毒染料法 qRT-PCR 阳性对照 (1×10E8 拷贝/μL)	50 μL (黄盖)
试剂八	沙核酸释放剂 (试用装)	20 次 (1mL, 绿盖)
试剂九	使用手册	1 份

## 运输及保存:

低温运输、-20°C保存, 有效期一年。

阳性对照需要因易污染其他成分需要单独放置。本产品不提供活体样品做阳性对照, 只提供 DNA 片段作为阳性对照。

## 自备试剂:

样品 RNA

## 使用方法:

### **一、稀释阳性对照:**

以 10E2-10E7 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。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原。

1. 标记 6 个离心管, 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 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)。
2. 在 7 号管中加入 5 μL 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照(本试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。
3. 换枪头, 在 6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。

4. 换枪头, 在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。

## 二、样品 DNA 的制备:

5. 如果有 N 个样品, 必须设置 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 $\mu\text{L}$  上步制备的阳性对照梯度稀释液中的第 4 号 (浓度为  $1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ , 10 $\mu\text{L}$  相当于 1 万拷贝) 再加上一定量的水作为制备的阳性对照 (加水后其总体积跟样品一样, 样品体积多少取决于所用试剂盒的要求)。可以用水作为制备的阴性对照。

6. 用自选方法纯化 N+2 个样品的 RNA, 本试剂盒跟市场上大多数病毒 RNA 提取试剂盒兼容。

## 三、设置 RT-PCR 反应 (20 $\mu\text{L}$ 体系, 在样品制备室进行):

7. 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, 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 (用第 4 号阳性对照稀释液做模板)。下面只描述定量分析的步骤, 定性分析只是把 6 个标曲反应缩减成 1 个, 其余不变。

8. 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, 阳性对照样品要等所有管子盖上盖子后最后加):

成分	N+2 个制备所得样品	qRT-PCR 阴性对照	qRT-PCR 阳性对照 (2-7 管)
2 $\times$ qRT-PCR 缓冲液	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	各 10 $\mu\text{L}$
猪流行性腹泻病毒染料	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	各 2 $\mu\text{L}$

法 qRT-PCR 引物混合物			
50×ROX (见注)	0.4μL	0.4μL	各 0.4μL
样品制备所得 RNA 模板 (来于第 8 步)	5.6μL	--	--
稀释所得 6 个阳性对照 (来于第 6 步)	--	--	各 5.6μL (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管...)
超纯水	--	5.6μL	--
10×qRT-PCR 酶混合液	2μL	2μL	2μL

**注:** 需使用 ROX 染料 I 的机型: ABI Prism7000、7300、7700、7900HT、

Step-One、Step-One Plus。

需使用 ROX 染料 II 的机型: : ABI Prism 7500、7500Fast、MJ Research 的

Chromo4、Opticon (II) Corbett Rotor Gene 3000。

不需要使用 ROX 的机型: Thermal Cycle Dice Real Time System, LightCycler、Smart

Cycler System、Agilent Mx3000P、RotorGene3000、RotorGene 6000。

9. 上机后按下面参数进行 RT-PCR (参数可能会因仪器不同而需优化)。

过程	温度	时间
RT (逆转录)	50°C	15-30 min
预变性	95°C	5 min
Qrt-PCR 反应 (40 个循环)	95°C	15 sec
	58°C	1 min, (采集 FAM 通道的荧光信号)
按仪器预设程序进行溶解曲线分析		

#### 四、数据处理:

10. 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。

11. 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 30。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。

**所有产品仅供科研使用, 不得用于其他用途。**