

塞内卡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

订购热线 : 021 - 54720761

咨询电话 : 13166274223(微信同号)

产品及特点:

塞内卡病毒 (Seneca virus A, SVA) , 曾被称为塞内卡谷病毒 (Seneca valleyvirus, SVV) , 为无囊膜的单股正链 RNA 病毒, 是小 RNA 病毒科塞内卡病毒属唯一成员, 基因组全长约 7.2kb。SVA 主要导致发病猪蹄部和口鼻出现水疱、溃烂、跛行; 新生仔猪出现腹泻、神经症状并引起急性死亡, 死亡率在 15%~30%。目前该病在我国个别地区零星散发, 有流行扩大的趋势, 对我国生猪产业造成潜在威胁。本产品是基于染料法荧光定量 PCR 原理开发, 专门检测塞内卡病毒的试剂盒。

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. 根据塞内卡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 30μL 体系的 RT-PCR。

规格及成分:

编号	成分	规格
----	----	----

试剂一	2 × qRT-PCR 缓冲液	500 μL (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	塞内卡病毒染料法 qRT-PCR 引物混合液	100 μL (白盖)
试剂七	塞内卡病毒染料法 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 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 μL 上步制备的阳性对照梯度稀释液中的第 4 号 (浓度为 1×10^4 拷贝/ μL ，10 μL 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 μL 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 μL	10 μL	各 10 μL
塞内卡病毒染料法	2 μL	2 μL	各 2 μL

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 Prism 7000、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。