伪狂犬病病毒探针法 qPCR 试剂盒

Pseudorabies Virus Probe qPCR Kit

目录号：ml107759

使用说明书

产品及特点	伪狂犬病病毒（Pseudorabies virus，PRV）又称猪疱疹病毒 I 型，会引起伪狂犬病，病猪的临床症状和病程随年龄不同而有很大差异：哺乳仔猪为敏感，15 日龄以内的仔猪常表现为急性型，主要表现为体温升高、拉稀、发抖、运动不协调、流涎、颈部肌肉僵硬、四肢划水样运动，昏迷死亡；育肥猪则大多数伴有体温升高，呼吸困难，一般不发生死亡，耐过后呈长朗隐性感染带毒或排毒；成年猪常不呈现可见临床症状或仅表现为轻微体温升高，一般不发生死亡。母猪妊娠初期，可在感染后的 20 天左右发生流产，在妊娠后期，经常发生死胎和木乃伊，或者产出弱胎和死胎。在完成猪瘟净化的地区，伪狂犬病被认为是对经济影响大的猪病毒病，因此伪狂犬病病毒的快速准确鉴定对该病的预防和检疫有着重要作用，为此本公司开发了简单快捷的伪狂犬病病毒探针法荧光定量 PCR 检测试剂盒，

它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板。

2. 引物和探针经过优化，灵敏性高。

3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。

4. 特异性高，引物是根据伪狂犬病病毒设计，不会跟其他病毒株 DNA 发生交叉反应。

5. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。

6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	0.5mL	0.5mL 本色盖
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管
伪狂犬病病毒 qPCR 引物-探针干粉	50 次	1.5mL 棕色管
伪狂犬病病毒 qPCR 阳性对照(1×10E7 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		

注 意： 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 162μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。

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。

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，用带芯枪头，下同。

3. 在 6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 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 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 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 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E4 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 DNA 的制备

7. 如果有 N 个样品，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 10μL 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟核酸制备试剂盒所要求的起始样本体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。

8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 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 qPCR 反应(20μL 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 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。

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加）：

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
伪狂犬病病毒 qPCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7μL	不加	不加
超纯水	不加	7μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液（1-6 号）	不加	不加	各 7μL

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：

过程	温度	时间
预变性	95℃	10min.
PCR 反应（40 个循环）	95℃	15sec
	60℃	60sec（采集 FAM 通道的荧光信号，设置 BHQ 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 DNA 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，则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 大于或等于 35。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 35，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 35，则为阴性。如果 Ct 小于 35 则为阳性。

自备试剂	样品 DNA。
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。