

天
净
沙
系
列

CAT#:14-15000
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

犬细小病毒荧光定量 PCR 检测试剂盒(染料法)
Canine Parvovirus qPCR Kit (Dye based)

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

| <p>产品及特点</p> | <p>犬细小病毒(Canine Parvovirus, CPV)在分类上属细小病毒属细小病毒科，是一种单链 DNA 病毒。CPV 是感染犬、猫、狼、狐等动物并引起细小病毒病，感染率高达 100%，致死率 10-50%。PCR 是目前检测 CPV 最灵敏的方法，本产品就是定性 PCR 产品（产品编号 11-150）基础升级的定量 PCR 检测试剂盒，专门用于定量鉴定检测 CPV。本试剂盒具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 根据 CPV 衣壳蛋白基因 VP2 设计的针对 CPV 的 PCR 引物，专一性强。 2. 即开即用，用户只需要提供样品模板，操作简单，定量准确快速。 3. 一管式荧光定量 PCR 检测，避免后续污染。 4. 本试剂盒足够 100 次 20uL 反应体系的荧光定量 PCR。 5. 本产品只适用于科研，不能用于临床诊断。 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|--|---------------|--|----|----|------------|-----------------|-------|---------------|-----|--------|---------------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-----------------------------------|------------|--------------|------|------------|-----|
| <p>规格及成分</p> | <table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装（去纸托）</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×qPCR MagicMix</td> <td>90408</td> <td>1.0 mL（装 A 袋）</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>100935</td> <td>1 mL×2（装 A 袋）</td> </tr> <tr> <td>引物 14-15000F</td> <td>yw14-15000f</td> <td>1 OD（装 B 袋）</td> </tr> <tr> <td>引物 14-15000R</td> <td>yw14-15000r</td> <td>1 OD（装 B 袋）</td> </tr> <tr> <td>犬细小病毒 VP2 基因阳性对照 (10E8copy/μL)</td> <td>14-15000pc</td> <td>50 μL（装 C 袋）</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>14-15000sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table> | | | 成分 | 编号 | 十孔盒包装（去纸托） | 2×qPCR MagicMix | 90408 | 1.0 mL（装 A 袋） | 超纯水 | 100935 | 1 mL×2（装 A 袋） | 引物 14-15000F | yw14-15000f | 1 OD（装 B 袋） | 引物 14-15000R | yw14-15000r | 1 OD（装 B 袋） | 犬细小病毒 VP2 基因阳性对照 (10E8copy/μL) | 14-15000pc | 50 μL（装 C 袋） | 使用手册 | 14-15000sc | 1 份 |
| 成分 | 编号 | 十孔盒包装（去纸托） | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2×qPCR MagicMix | 90408 | 1.0 mL（装 A 袋） | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 超纯水 | 100935 | 1 mL×2（装 A 袋） | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 引物 14-15000F | yw14-15000f | 1 OD（装 B 袋） | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 引物 14-15000R | yw14-15000r | 1 OD（装 B 袋） | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 犬细小病毒 VP2 基因阳性对照 (10E8copy/μL) | 14-15000pc | 50 μL（装 C 袋） | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 使用手册 | 14-15000sc | 1 份 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>运输及保存</p> | <p>低温运输、-20℃保存(A 袋和 B 袋的试剂放样品准备区、C 袋的阳性对照最好跟 A 袋和 B 袋的成分分开放置)，有效期一年。</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>自备试剂</p> | <p>DNA 模板、10×ROX（根据机型决定，具体见使用方法）。</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>使用方法</p> | <p>一、样品 DNA 的制备</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒 DNA 提取试剂盒兼容，也可以选购本公司的柱式病毒 DNAout。 <p>二、引物的制备（在样品制备室进行）</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. 按引物标签提示在装引物干粉的管中直接加入适量的超纯水（加入量见引物试管上的标签），使得两条引物的浓度均为 10 μM（10pmol/μL），然后各取 110 μL 混合在一起，标注为引物混合物，放冰上待用。此引物混合物足够 100 次 PCR。 <p>三、稀释阳性对照（以 10E2-10E7 这 6 个 10 倍稀释度为例。由于阳性对照浓度非常高，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，只提供可以直接使用的长为 180bp 的 DNA 片段作为阳性对照。</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

3. 标记 6 个离心管，分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。
4. 用带芯枪头分别加入 45 μL 超纯水（最好用带芯枪头，下同）。
5. 在 7 号管中加入 5 μL 本试剂盒提供的 $10\text{E}8$ 拷贝/ μL 的阳性对照，充分震荡 1 分钟，得 $10\text{E}7$ 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
6. 换枪头，在 6 号管中加入 5 μL $10\text{E}7$ 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $10\text{E}6$ 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
7. 换枪头，从 6 号管中取 5 μL 溶液到 5 号管中，充分震荡 1 分钟，得 $10\text{E}5$ 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
8. 换枪头，从 5 号管中取 5 μL 溶液到 4 号管中，得 $10\text{E}4$ 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。

三、设置 PCR 反应 (20 μL 体系，在样品制备室进行)

9. 在 PCR 管中加入下列成分（待测样品需要做三次重复，下表只列出一次。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最后加）：

| 成分 | 样品 | 阴性对照 | 阳性对照(2-7 管) |
|--------------------------|-------------------|------------------|--|
| 2 \times qPCR MagicMix | 10 μL | 10 μL | 各 10 μL |
| 引物混合物 | 2 μL | 2 μL | 各 2 μL |
| 自备 10 \times ROX (见注) | 2 μL | 2 μL | 各 2 μL |
| 待测样品 DNA 模板 | 1-5 μL | 不加 | 不加 |
| 阳性对照 (2-7 号) | 不加 | 不加 | 各 5 μL (2 号样到 2 号管,3 号样到 3 号管...) |
| 补水到 | 20 μL | 20 μL | 20 μL |

注:仅 ABI7500、7700 和 7900 仪器需要使用 ROX 作为对照，其他荧光 PCR 仪器 (如 iCycler IQ、MJ Option、MJ Chromo4、MX3000、MX4000、RotorGene 3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480) 不需要使用 ROX。

10. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR（可以根据仪器不同而自行优化）。

| 过程 | 温度 | 时间 |
|--------------------|-----------------------|------|
| 预变性 | 94 $^{\circ}\text{C}$ | 2 分钟 |
| PCR 反应 (40 个循环) | 94 $^{\circ}\text{C}$ | 15 秒 |
| | 60 $^{\circ}\text{C}$ | 30 秒 |

11. 数据采集

| | |
|-------------|--|
| | <p>在每个循环的第二步进行荧光信号的采集，具体操作按所用仪器推荐的流程进行。</p> <p>本产品中所含的荧光染料在不结合 DNA 时，最大吸收光谱在 471 nm，结合 DNA 时的最大吸收光谱在 500 nm，最大发射光谱在 530 nm。</p> <p>四、数据处理</p> <p>12. 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。再以待测样品浓度的 log 和标准曲线计算出样品 DNA 的浓度。</p> |
| 关联产品 | PCR 抑制物清除剂(CAT#:60804)，即用型荧光定量 PCR 试剂盒 (CAT#:90408-1) |