

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:14-21400  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

猫细小病毒染料法荧光定量 PCR 试剂盒  
Feline Parvovirus (FPV) qPCR Kit

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](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>猫细小病毒 (Feline Parvovirus, FPV) 又称为猫传染性肠炎病毒, 会引起猫科动物之间的传染病, 以高热、呕吐、白细胞严重减少和肠炎为特征, 感染病毒后, 病猫会迅速脱水, 消瘦, 眼窝深陷, 被毛凌乱, 皮肤无弹性, 耳鼻, 四肢发凉, 精神高度沉郁, 休克, 死亡。从病初症状轻微到严重一般不超过 2 天, 整个病程一般不超过一周, 发病迅速, 传播范围广, 对猫科动物健康造成严重损害, 因此快速检测猫细小病毒具有重要意义。为此本公司开发了简单快捷的猫细小病毒通用染料法荧光定量 PCR 检测试剂盒, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 即开即用, 用户只需要提供病毒样品。</li> <li>2. 根据猫细小病毒保守序列设计的专一性引物, 与相关病毒无交叉反应。</li> <li>3. 灵敏度可以达到几百拷贝/反应。</li> <li>4. 一管式荧光定量 PCR 检测, 避免后续污染。</li> <li>5. 本试剂盒足够 50 次 20<math>\mu</math>L 反应体系的荧光定量 PCR。</li> <li>6. 本产品只适用于科研, 不能用于临床诊断。</li> </ol>																							
<p><b>规格及成分</b></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2<math>\times</math>qPCR MagicMix</td> <td>90408</td> <td>500<math>\mu</math>L (棕色管)</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>180701</td> <td>1 mL (黄盖)</td> </tr> <tr> <td>猫细小病毒 PCR 引物混合物</td> <td>14-21400yw</td> <td>100<math>\mu</math>L (白盖)</td> </tr> <tr> <td>猫细小病毒 PCR 阳性对照 (1<math>\times</math>10E8 拷贝/<math>\mu</math>L)</td> <td>14-21400pc</td> <td>50<math>\mu</math>L (黄盖)</td> </tr> <tr> <td>天净沙核酸释放剂</td> <td>61202</td> <td>20 次 (1 mL, 绿盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>14-21400sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	十孔盒包装	2 $\times$ qPCR MagicMix	90408	500 $\mu$ L (棕色管)	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (黄盖)	猫细小病毒 PCR 引物混合物	14-21400yw	100 $\mu$ L (白盖)	猫细小病毒 PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E8 拷贝/ $\mu$ L)	14-21400pc	50 $\mu$ L (黄盖)	天净沙核酸释放剂	61202	20 次 (1 mL, 绿盖)	使用手册	14-21400sc	1 份
成分	编号	十孔盒包装																						
2 $\times$ qPCR MagicMix	90408	500 $\mu$ L (棕色管)																						
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (黄盖)																						
猫细小病毒 PCR 引物混合物	14-21400yw	100 $\mu$ L (白盖)																						
猫细小病毒 PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E8 拷贝/ $\mu$ L)	14-21400pc	50 $\mu$ L (黄盖)																						
天净沙核酸释放剂	61202	20 次 (1 mL, 绿盖)																						
使用手册	14-21400sc	1 份																						
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输、-20<math>^{\circ}</math>C 保存, 有效期一年。</p>																							
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>DNA 模板、10<math>\times</math>ROX (根据机型决定, 具体见使用方法)。</p>																							
<p><b>使用方法</b></p>	<p><b>一、稀释 PCR 阳性对照</b> (以 10E2-10E7 拷贝/<math>\mu</math>L 这 6 个 10 倍稀释度为例)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 注意: 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, 只提供可以直接使用的 DNA 片段作为阳性对照。</li> <li>2. 标记 6 个离心管, 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。</li> <li>3. 用带芯枪头分别加入 45 <math>\mu</math>L 荧光 PCR 专用模板稀释液 (最好用带芯枪头, 下同)。</li> <li>4. 在 7 号管中加入 5 <math>\mu</math>L 1<math>\times</math>10E8 拷贝/<math>\mu</math>L 的阳性对照, 充分震荡 1 分钟, 得 1<math>\times</math>10E7 拷贝/<math>\mu</math>L 的阳性对照。放冰上待用。</li> <li>5. 换枪头, 在 6 号管中加入 5 <math>\mu</math>L 1<math>\times</math>10E7 拷贝/<math>\mu</math>L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分</li> </ol>																							

震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。

6. 换枪头，在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照到 5 号管中，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。
7. 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

8. 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 PCR 阳性对照的第 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）或第 5 号（浓度为  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ，10 $\mu\text{L}$  相当于 10 万拷贝）再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。如果每次制备需要 200 $\mu\text{L}$  样品，则 PC 和 NC 的体积也必须是 200 $\mu\text{L}$ 。
9. 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一管式病毒 DNAout 或其升级版柱式病毒 DNAout。本试剂盒免费赠送 15 次一管式病毒 DNAout，其使用手册可从本公司网站 [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com) 通过搜索产品名称一管式病毒 DNAout 或产品编号 3674 下载。

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

10. 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，浓度为 10000 拷贝/ $\mu\text{L}$ ）。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。
11. 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最后加）：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性 对照管	PCR 阳性 对照管 (2-7 管)
2 $\times$ qPCR MagicMix	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	各 10 $\mu\text{L}$
猫细小病毒 PCR 引物混合液	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	各 2 $\mu\text{L}$
自备 10 $\times$ ROX (见注)	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	各 2 $\mu\text{L}$
N+2 个制备样品 DNA	6 $\mu\text{L}$	不加	不加
第 7 步所得 PCR 阳性对照 稀释液 (2-7 号)	不加	不加	各 6 $\mu\text{L}$ (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管...)

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, 则用水替代。

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

过程	温度	时间
预变性	94℃	5 分钟
PCR 反应 (40 个循环)	94℃	30 秒
	52℃	60 秒 (采集 FAM 通道荧光信号)
	72℃	60 秒

#### 四、数据处理

13. 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。
14. 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。

#### 关联产品

猫细小病毒 LAMP 恒温检测试剂盒