

天
净
沙
系
列

CAT#:14-23000
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

非洲猪瘟病毒染料法荧光定量 PCR 试剂盒
ASFC SYBR qPCR Kit

使用手册 V1.1

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>非洲猪瘟(African Swine Fever、ASF)是由非洲猪瘟病毒(African Swine Fever Virus、ASFV) 引起猪的一种急性、热性、高度接触传染性疾病,病死率几乎高达 100%, ASF 最近在我国爆发, 给我国养猪业造成重大损失, 因此 ASFV 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 ASFV 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"> 1. 即开即用, 用户只需要提供病毒样品。 2. 根据 ASFV P72 基因的保守序列设计的专一性引物, 与相关病毒无交叉反应。 3. 灵敏度可以达到几百拷贝/反应。 4. 一管式荧光定量 PCR 检测, 避免后续污染。 5. 本试剂盒足够 50 次 20μL 反应体系的荧光定量 PCR。 6. 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\timesqPCR MagicMix</td> <td>90408</td> <td>500μL (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>非洲猪瘟病毒 PCR 引物混合物</td> <td>14-23000yw</td> <td>100μL (白盖)</td> </tr> <tr> <td>非洲猪瘟病毒 P72 基因 PCR 阳性对照 V2.0(1\times10E8 拷贝/μL)</td> <td>14-23000pc</td> <td>50μL (红盖)</td> </tr> <tr> <td>DNA 病毒裂解液 (试用装)</td> <td>3674a</td> <td>15 次 (9 mL)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>14-23000sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	十孔盒包装(去纸托)	2 \times qPCR MagicMix	90408	500 μ L (棕色管)	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (黄盖)	非洲猪瘟病毒 PCR 引物混合物	14-23000yw	100 μ L (白盖)	非洲猪瘟病毒 P72 基因 PCR 阳性对照 V2.0(1 \times 10E8 拷贝/ μ L)	14-23000pc	50 μ L (红盖)	DNA 病毒裂解液 (试用装)	3674a	15 次 (9 mL)	使用手册	14-23000sc	1 份
成分	编号	十孔盒包装(去纸托)																						
2 \times qPCR MagicMix	90408	500 μ L (棕色管)																						
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (黄盖)																						
非洲猪瘟病毒 PCR 引物混合物	14-23000yw	100 μ L (白盖)																						
非洲猪瘟病毒 P72 基因 PCR 阳性对照 V2.0(1 \times 10E8 拷贝/ μ L)	14-23000pc	50 μ L (红盖)																						
DNA 病毒裂解液 (试用装)	3674a	15 次 (9 mL)																						
使用手册	14-23000sc	1 份																						
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输、-20$^{\circ}$C 保存, 有效期一年。</p>																							
<p>自备试剂</p>	<p>DNA 模板、10\timesROX (根据机型决定, 具体见使用方法)。</p>																							
<p>使用方法</p>	<p>一、稀释 PCR 阳性对照 (以 10E2-10E7 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例)</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。 2. 标记 6 个离心管, 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。 3. 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)。 4. 在 7 号管中加入 5 μL 1\times10E8 拷贝/μL 的阳性对照, 充分震荡 1 分钟, 得 1\times10E7 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。 5. 换枪头, 在 6 号管中加入 5 μL 1\times10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1\times10E6 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。 																							

6. 换枪头, 在 5 号管中加入 5 μL 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照到 5 号管中, 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^5 拷贝/ μL 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 μL 上步制备的 PCR 阳性对照的第 4 号(浓度为 1×10^4 拷贝/ μL , 10 μL 相当于 1 万拷贝)或第 5 号(浓度为 1×10^5 拷贝/ μL , 10 μL 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 μL 样品, 则 PC 和 NC 的体积也必须是 200 μL 。
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 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 μL 体系, 在样品制备室进行)

10. 如果只做 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 PCR 阳性对照。如果做 2-3 次重复, 则反应设置数量相应增加 2 或 3 倍。
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 (棕色管)	10 μL	10 μL	各 10 μL
非洲猪瘟病毒 PCR 引物 混合物 (白盖)	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	6 μL	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 μL (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 (30 个循环)	94℃	60 秒
	50℃	60 秒
	72℃	60 秒

13. 数据采集

具体操作按所用仪器推荐的流程进行。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。信号采集可以设置在复性或延伸步骤。

四、数据处理

14. 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。

关联产品

非洲猪瘟病毒 LAMP 恒温检测试剂盒