

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:14-23300  
低温运输, -20°C保存

**TIANDZ**

牛冠状病毒荧光 RT-PCR 检测试剂盒

Bovine Coronavirus qRT-PCR 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>牛冠状病毒 (Bovine Coronavirus, BCoV) 属于冠状病毒科, 冠状病毒属 2a 亚群, 是引起新生犊牛腹泻、成年牛冬痢和呼吸道感染的重要病原。流行病学调查表明, 牛冠状病毒在牛场中普遍存在, 主要通过消化道和呼吸道传播, 感染的牛长期带毒并在一定时期内持续排毒, 易造成牛群的大范围感染。因此, 对带毒牛的及时检出和牛场环境监测就显得尤为重要。本产品就是专门用于牛冠状病毒的快速荧光 RT-PCR 检测的试剂盒, 在毒牛或牛场环境的检测领域有广泛用途, 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 RNA 模板。</li> <li>2. 使用 RNase H 已经突变的 SuperMMLV 逆转录酶, 减少了 RT 过程中 RNA 的降解。</li> <li>3. 使用热启动的 Taq DNA 聚合酶, 降低了非特异性扩增。</li> <li>4. 荧光定量检测, 所含 SYBR Green I 只与双链 DNA 结合, 反应特异性强。适用于不需要 ROX 做校正染料的荧光 PCR 仪。</li> <li>5. 产品的有效线性范围广, 定量更加准确。</li> <li>6. 引物经过优化, 特异性高, 不会误检牛轮状病毒 (BRV)、牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 和牛流行热病毒 (BEFV) 等常见牛类病毒。</li> <li>7. 引物是根据保守的 N 基因设计, 产物长度为 100 bp。</li> </ol>																																
<p><b>规格及成分</b></p>	<table border="1" data-bbox="491 1249 1449 1865"> <thead> <tr> <th>成 份</th> <th>编 号</th> <th>50 次塑料袋包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SuperMMLV 逆转录酶</td> <td>60906A</td> <td>100 uL</td> </tr> <tr> <td>RT Buffer (含 dNTP)</td> <td>60906B</td> <td>250 uL</td> </tr> <tr> <td>2×荧光 PCR Mix</td> <td>90408</td> <td>1.5 mL</td> </tr> <tr> <td>BCoV 专一性引物一</td> <td>yw1273</td> <td>100 uL</td> </tr> <tr> <td>BCoV 专一性引物二</td> <td>yw1274</td> <td>100 uL</td> </tr> <tr> <td>BCoV 标准品 (<math>1.16 \times 10^{E11}</math> 拷贝/uL)</td> <td>yw12751276</td> <td>40uL</td> </tr> <tr> <td>DNA 稀释液</td> <td>121206-10</td> <td>10mL</td> </tr> <tr> <td>RNase-free 水</td> <td>80403</td> <td>1 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td colspan="2">1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成 份	编 号	50 次塑料袋包装	SuperMMLV 逆转录酶	60906A	100 uL	RT Buffer (含 dNTP)	60906B	250 uL	2×荧光 PCR Mix	90408	1.5 mL	BCoV 专一性引物一	yw1273	100 uL	BCoV 专一性引物二	yw1274	100 uL	BCoV 标准品 ( $1.16 \times 10^{E11}$ 拷贝/uL)	yw12751276	40uL	DNA 稀释液	121206-10	10mL	RNase-free 水	80403	1 mL	使用手册	1 份	
成 份	编 号	50 次塑料袋包装																															
SuperMMLV 逆转录酶	60906A	100 uL																															
RT Buffer (含 dNTP)	60906B	250 uL																															
2×荧光 PCR Mix	90408	1.5 mL																															
BCoV 专一性引物一	yw1273	100 uL																															
BCoV 专一性引物二	yw1274	100 uL																															
BCoV 标准品 ( $1.16 \times 10^{E11}$ 拷贝/uL)	yw12751276	40uL																															
DNA 稀释液	121206-10	10mL																															
RNase-free 水	80403	1 mL																															
使用手册	1 份																																
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输, -20℃保存, 保存期限为 12 个月。</p>																																
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>样品 RNA</p>																																
<p><b>使用方法</b></p>	<p>一、样品 RNA 的制备</p>																																

用自选方法纯化 BCoV 样品的 RNA，也可以另购本公司的一管式病毒 RNAout 或柱式病毒 RNAout，上述两款产品跟本试剂盒兼容。

## 二、RT（逆转录）反应合成 cDNA

按照下表配制 RT 反应体系（20 uL 体系）：

成份	用量
RNA 模板（自备）	由于一般不知病毒 RNA 浓度,用 1-10 uL 即可
BCoV 专一性引物二	2 uL
RNase-free 水	补水到 13 uL
70℃保温 5 min 变性模板后立即冰浴。	
RT Buffer(含 dNTP)	5 uL
37℃保温 5 min。	
SuperMMLV 逆转录酶	2 uL
42℃保温 60 min。此步为 RT 反应。	
70℃保温 10 min 以终止反应，然后放置在冰上待用。合成的 cDNA 可以直接作为 PCR 模板使用，不需要纯化。	

## 三、设置荧光 PCR 反应（50 uL 体系）

1. 配制 8-10 个浓度范围的标准品：用 DNA 稀释液将 BCoV 标准品稀释成 8-10 个浓度，待用。
2. 在 PCR 管中加入下列成分（N 跟据稀释度由客户自己决定）：

成份	样品	标准品 (8-10 管)	阴性对照
2×qPCR Mix	25 uL	25 uL	25 uL
cDNA 样品（上步的 RT 反应液）	1-5 uL	无	无
标准品(8-10 个浓度)	无	N uL 每管	无
BCoV 专一性引物一	2 uL	2 uL	2 uL
BCoV 专一性引物二	2 uL	2 uL	2 uL
补水到	50 uL		

3. 上机进行 PCR。荧光定量 PCR 反应参数为（以 ABI7500 荧光定量 PCR 仪为参考）：

过程	温度	时间
预变性（此步用于活化热启动 Taq 聚合酶）	95℃	30 s

	PCR 反应 (35-40 个循环)	95℃	5 s
		60℃	30 s
		72℃	10 min
	熔解曲线分析	95℃	5 s
		65℃	1 min
		95℃	15 s
		50℃	30 s
	4. 根据 8-10 个标准品的 Ct 值 (X 轴) 和浓度 (X 轴) 描出标准曲线, 用待测样品 Ct 值推出其浓度。		
<b>关联产品</b>	牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 核酸检测试剂盒 (RT-PCR) (CAT#: 11-2325)		