

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:14-42300  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

猪瘟病毒通用染料法荧光定量 RT-PCR 试剂盒  
Classical Swine Fever Virus Universal SYBR  
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>猪瘟疫病毒 (Classical Swine Fever Virus, CSFV; 或称 Hog Cholera Virus, HCV) 是 ssRNA 病毒, 属黄病毒科瘟病毒属, 其 RNA 为单股正链。由 CSFV 引起的猪瘟疫病是一种急性、热性、高度接触性的传染病, 广泛存在于全世界各养猪国家, 严重危害养猪业的发展。因此, CSFV 的快速准确鉴定, 对该病的预防和检疫有着重要作用。为此本公司基于染料法荧光定量 RT-PCR 技术开发了快速检测 CSFV 的试剂盒, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 使用本公司开发的一管式荧光定量 RT-PCR 试剂盒, 灵敏度比常规 RT-PCR 高 2-3 个数量级, 可以达到几百拷贝/反应。</li> <li>2. 封闭式, 避免扩张产物对后续实验的污染。</li> <li>3. 根据猪瘟疫病毒的保守序列设计的专一性 RT-PCR 引物, 与相关病毒无交叉反应。</li> <li>4. 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。</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 RT-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>qRT-PCR 缓冲液</td> <td>190101a</td> <td>500<math>\mu</math>L (棕色管)</td> </tr> <tr> <td>10<math>\times</math>qRT-PCR 酶混合液</td> <td>190101b</td> <td>100<math>\mu</math>L (红盖)</td> </tr> <tr> <td>ROX 染料 I, 50<math>\times</math></td> <td>190101c</td> <td>20<math>\mu</math>L (棕色管)</td> </tr> <tr> <td>ROX 染料 II, 50<math>\times</math></td> <td>190101d</td> <td>20<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>古典猪瘟疫病毒 RT-PCR 引物混合物</td> <td>14-42300yw</td> <td>100<math>\mu</math>L (白盖)</td> </tr> <tr> <td>古典猪瘟疫病毒 RT-PCR 阳性对照 (1<math>\times</math>10E8 拷贝/<math>\mu</math>L)</td> <td>14-42300pc</td> <td>50<math>\mu</math>L (紫盖)</td> </tr> <tr> <td>RNA 病毒裂解液 (试用装)</td> <td>3073a</td> <td>15 次 (9 mL)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>14-42300sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	十孔盒包装	2 $\times$ qRT-PCR 缓冲液	190101a	500 $\mu$ L (棕色管)	10 $\times$ qRT-PCR 酶混合液	190101b	100 $\mu$ L (红盖)	ROX 染料 I, 50 $\times$	190101c	20 $\mu$ L (棕色管)	ROX 染料 II, 50 $\times$	190101d	20 $\mu$ L (棕色管)	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (黄盖)	古典猪瘟疫病毒 RT-PCR 引物混合物	14-42300yw	100 $\mu$ L (白盖)	古典猪瘟疫病毒 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E8 拷贝/ $\mu$ L)	14-42300pc	50 $\mu$ L (紫盖)	RNA 病毒裂解液 (试用装)	3073a	15 次 (9 mL)	使用手册	14-42300sc	1 份
成分	编号	十孔盒包装																															
2 $\times$ qRT-PCR 缓冲液	190101a	500 $\mu$ L (棕色管)																															
10 $\times$ qRT-PCR 酶混合液	190101b	100 $\mu$ L (红盖)																															
ROX 染料 I, 50 $\times$	190101c	20 $\mu$ L (棕色管)																															
ROX 染料 II, 50 $\times$	190101d	20 $\mu$ L (棕色管)																															
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (黄盖)																															
古典猪瘟疫病毒 RT-PCR 引物混合物	14-42300yw	100 $\mu$ L (白盖)																															
古典猪瘟疫病毒 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E8 拷贝/ $\mu$ L)	14-42300pc	50 $\mu$ L (紫盖)																															
RNA 病毒裂解液 (试用装)	3073a	15 次 (9 mL)																															
使用手册	14-42300sc	1 份																															
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输、-20<math>^{\circ}</math>C 保存(阳性对照最好分开放置), 有效期一年。</p>																																
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>RNA 模板</p>																																
<p><b>使用方法</b></p>	<p>一、<b>稀释阳性对照</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: 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核酸片段作为阳性对照。下列稀释操作一定要在独立的区域进行, 不能污染其他成分。</li> <li>2. 标记 6 个 RNase-free 离心管, 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。</li> <li>3. 用带芯 RNase-free 枪头分别加入 45 <math>\mu</math>L 荧光 PCR 专用模板稀释液。</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</li> </ol>																																

1×10<sup>7</sup> 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 1×10<sup>7</sup> 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10<sup>6</sup> 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。
6. 换枪头，从 5 号管中加入 5 μL 1×10<sup>6</sup> 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10<sup>5</sup> 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 RNA 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 10μL 上步制备的阳性对照梯度稀释液中的第 4 号 (浓度为 1×10<sup>4</sup> 拷贝/μL，10μL 相当于 1 万拷贝) 或第 5 号 (浓度为 1×10<sup>5</sup> 拷贝/μL，10μL 相当于 10 万拷贝) 再加上一定量的水作为制备的阳性对照 (加水后其总体积跟样品一样，样品体积多少取决于所用试剂盒的要求)。可以用水作为制备的阴性对照。
9. 用自选方法纯化 N+2 个样品的 RNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒 RNA 提取试剂盒兼容。本试剂盒免费赠送 15 次 RNA 病毒裂解液试用装 (一管式病毒 RNAout 的成分)，其使用手册可以从本公司网站 [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com)，通过搜索产品名称一管式病毒 RNAout 或产品编号 3073 下载。

## 三、设置 RT-PCR 反应 (20μL 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 RT-PCR 阴性对照，6 个用于 RT-PCR 阳性对照)。如果做 2-3 次重复，则反应设置数量相应增加。
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后最后加)：

成分	N+2 个制备所得样品	RT-PCR 阴性对照	RT-PCR 阳性对照 (2-7 管)
2×qRT-PCR 缓冲液	10μL	10μL	各 10μL
猪瘟病毒 RT-PCR 引物混合物	2μL	2μL	各 2μL
50×ROX (见注)	0.4μL	0.4μL	各 0.4μL
样品制备所得 RNA 模板 (来于第 8 步)	5.6μL	不加	不加
稀释所得 6 个阳性对照 (来于第 7 步)	不加	不加	各 5.6μL (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管...)
10×qRT-PCR 酶混合液	2μL	2μL	2μL

注:需使用 ROX 染料 I 的机型: ABI Prism7000、7300、7700、7900HT、Step-One、Step-One Plus。

需使用 ROX 染料 II 的机型: : ABI Prism 7500、7500Fast、MJ Research 的 Chromo4、Opticon (II) Corbett Rotor Gene 3000。

不需要使用 ROX 的机型: Thermal Cycle Dice Real Time System, LightCycler、Smart Cycler System、Agilent Mx3000P、RotorGene 3000、RotorGene 6000。

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

过程	温度	时间
RT (逆转录)	50℃	15-30 分钟
预变性	94℃	2 分钟
RT - PCR 反应 (30 个循环)	94℃	30 秒
	55℃	30 秒
	72℃	60 秒 (采集 SYBR 通道的荧光信号)
按仪器预设程序进行溶解曲线分析		

#### 四、数据处理

13. 如果 PCR 阳性对照和 PCR 阴性对照均得到预期阳性和阴性结果,则说明 PCR 有效,可以进行后续分析。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 PCR 阳性对照或 PCR 阴性对照任何一个没有得到预期阳性和阴性结果 (如 PCR 阳性对照没有扩增,或阴性对照出现扩增),则说明 PCR 实验无效或污染,不需要进行后续分析,需要重复 PCR 或请跟厂家联系。
15. 如果样品制备阳性对照或样品制备阴性对照均得到预期阳性和阴性结果,说明样品制备操作有效,实验结果有效。
16. 如果样品制备阳性对照或样品制备阴性对照任何一个没有得到预期结果 (如样品制备阳性对照无扩增,或样品制备阴性对照有扩增),说明样品制备操作无效或有污染,实验结果无效,需要重复样品制备过程或请跟厂家联系。

#### 关联产品

Classical Swine Fever Virus 猪瘟疫病毒 RT-LAMP 恒温检测试剂盒