

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:14-79400  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

猫白血病病毒染料法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

Feline Leukemia Virus (FELV) 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>猫白血病病毒 (Feline Leukemia Virus, FELV) 会引起猫白血病, 猫白血病是一种猫常见的非创伤性致死疾病, 也是一种恶性肿瘤性传染病, 而且本病目前尚无有效的治疗方法, 对猫的健康造成严重损害, 因此快速检测猫白血病病毒具有重要意义。本产品基于荧光定量 RT-PCR 原理开发。它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 一站式, 用于不需要单独准备每种成分, 包括引物和对照。</li> <li>2. 根据 FELV 的保守基因序列设计的引物, 具有良好的特异性和亚型涵盖性(可扩 A、B、C 三种 FELV 亚型), 但又不会与其他病毒样品发生交叉反应。</li> <li>3. 基于染料法 qRT-PCR 检测, 灵敏度比常规 RT-PCR 高 10-100 倍, 可以达到至少 1000 拷贝/反应。</li> <li>4. 使用一管式 qRT-PCR 技术, RT 和 PCR 两步在一个试管内完成, 不需要中间转移样品, 降低了操作误差和可能的污染。</li> <li>5. 提供阳性对照, 便于分析实验结果。</li> <li>6. 本产品足够 50 次 30<math>\mu</math>L 体系的 RT-PCR, 只能用于科研, 不能用于临床。</li> </ol>																																
<p><b>规格及成分</b></p>	<table border="1" data-bbox="512 1003 1430 1624"> <thead> <tr> <th>成 份</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>1mL (亮黄盖)</td> </tr> <tr> <td>猫白血病病毒 PCR 引物混合液</td> <td>14-79400yw</td> <td>100 <math>\mu</math>L (白盖)</td> </tr> <tr> <td>猫白血病病毒 RT-PCR 阳性对照 (1<math>\times</math>10E8 拷贝/<math>\mu</math>L)</td> <td>14-79400pc</td> <td>50 <math>\mu</math>L (黄盖)</td> </tr> <tr> <td>RNA 病毒裂解液 (试用装)</td> <td>3073a</td> <td>15 次 (9mL)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>14-79400sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成 份	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	1mL (亮黄盖)	猫白血病病毒 PCR 引物混合液	14-79400yw	100 $\mu$ L (白盖)	猫白血病病毒 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E8 拷贝/ $\mu$ L)	14-79400pc	50 $\mu$ L (黄盖)	RNA 病毒裂解液 (试用装)	3073a	15 次 (9mL)	使用手册	14-79400sc	1 份
成 份	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	1mL (亮黄盖)																															
猫白血病病毒 PCR 引物混合液	14-79400yw	100 $\mu$ L (白盖)																															
猫白血病病毒 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E8 拷贝/ $\mu$ L)	14-79400pc	50 $\mu$ L (黄盖)																															
RNA 病毒裂解液 (试用装)	3073a	15 次 (9mL)																															
使用手册	14-79400sc	1 份																															
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输, -20<math>^{\circ}</math>C 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、<b>稀释阳性对照</b> (以 10E2-10E7 这 6 个 10 倍稀释度为例。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, 只提供无传染性的的 DNA 片段作为阳性对照。</p>																																

1. 标记 6 个离心管，分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。用带芯枪头分别加入 45  $\mu\text{L}$  荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同)。
2. 在 7 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(本试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。
3. 换枪头，在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。
4. 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(上步稀释所得)，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。
5. 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

6. 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 $\mu\text{L}$  上步制备的阳性对照梯度稀释液中的第 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) 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。
7. 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 (20 $\mu\text{L}$ 体系，在样品制备室进行)

8. 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。
9. 在标记管中按下表加入各成分：

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 $\times$ qRT-PCR 缓冲液	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	各 10 $\mu\text{L}$
猫白血病病毒 PCR 引物混合物	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	各 2 $\mu\text{L}$
50 $\times$ ROX (见注)	0.4 $\mu\text{L}$	0.4 $\mu\text{L}$	各 0.4 $\mu\text{L}$
样品制备所得 RNA 模板 (来于第 8 步)	5.6 $\mu\text{L}$	不加	不加
稀释所得 6 个阳性对照	不加	不加	各 5.6 $\mu\text{L}$ (2 号样

(来于第一步)			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。

10. 上机后按下面参数进行 RT-PCR (参数可能会因仪器不同而需优化)。

过程	温度	时间
RT (逆转录)	50°C	30 分钟
预变性	94°C	2 分钟
RT - PCR 反应 (40 个循环)	95°C	15 秒
	60°C	15 秒 (采集 FAM 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

11. 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。

12. 如果把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

猫白血病病毒可视化 RT-LAMP 检测试剂盒