

## 猪肠道甲型冠状病毒染料法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

咨询 QQ : 2881498726

订购热线 : 021 - 54720761

咨询电话 : 13166274233(微信同号)

### 产品及特点:

猪肠道甲型冠状病毒(Swine Enteric Alphacoronavirus, SeACoV)是一种 RNA 病毒, 可见感染仔猪出现腹泻和粪便病毒脱落的临床症状, 会给养殖业带来严重的经济损失, 因此快速准确鉴定对该病的预防和检疫有着重要作用。本产品基于 PCR 原理开发。

1. 一站式, 用于不需要单独准备每种成分, 包括引物和对照
2. 根据猪肠道甲型冠状病毒的保守基因序列设计的引物, 具有良好的特异性。
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。
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。
5. 本产品足够 50 次 30 $\mu$ L 体系的 RT-PCR。

### 规格及成分:

| 编号  | 成分  | 规格                |
|-----|---|-------------------|
| 试剂一 | 2 $\times$ qRT-PCR 缓冲液                      | 500 $\mu$ L (棕色管) |
| 试剂二 | 10 $\times$ qRT-PCR 酶混合液                    | 100 $\mu$ L (红盖)  |
| 试剂三 | ROX 染料 I, 50 $\times$                       | 20 $\mu$ L (棕色管)  |
| 试剂四 | ROX 染料 II, 50 $\times$                      | 20 $\mu$ L (棕色管)  |
| 试剂五 | 荧光 PCR 专用模板稀释液                              | 1mL (黄盖)          |
| 试剂六 | 猪肠道甲型冠状病毒染料法 qRT-PCR 引物混合液                  | 100 $\mu$ L (白盖)  |
| 试剂七 | 猪肠道甲型冠状病毒染料法 qRT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E8) | 50 $\mu$ L (黄盖)   |

|     |                     |                |
|-----|---------------------|----------------|
|     | 拷贝/ $\mu\text{L}$ ) |                |
| 试剂八 | 沙核酸释放剂 (试用装)        | 20 次 (1mL, 绿盖) |
| 试剂九 | 使用手册                | 1 份            |

## **运输及保存:**

低温运输、 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期一年。

阳性对照需要因易污染其他成分需要单独放置。本产品不提供活体样品做阳性对照, 只提供 DNA 片段作为阳性对照。

## **自备试剂:**

样品 RNA

## **使用方法:**

### **一、稀释阳性对照:**

以  $10^2$ - $10^7$  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。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原。

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。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:**

5. 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 $\mu$ 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<sup>4</sup> 拷贝/ $\mu$ L，10 $\mu$ 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。

6. 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。

### 三、设置 RT-PCR 反应 (20 $\mu$ L 体系，在样品制备室进行)：

7. 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 号阳性对照稀释液做模板）。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。

8. 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，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 | qRT-PCR 阴性对照 | qRT-PCR 阳性对照 (2-7 管)                      |
|----------------------------|-------------|--------------|---|
| 2 $\times$ qRT-PCR 缓冲液     | 10 $\mu$ L  | 10 $\mu$ L   | 各 10 $\mu$ L                              |
| 猪肠道甲型冠状病毒染料法 qRT-PCR 引物混合物 | 2 $\mu$ L   | 2 $\mu$ L    | 各 2 $\mu$ L                               |
| 50 $\times$ ROX (见注)       | 0.4 $\mu$ L | 0.4 $\mu$ L  | 各 0.4 $\mu$ L                             |
| 样品制备所得 RNA 模板 (来于第 8 步)    | 5.6 $\mu$ L | --           | --  |
| 稀释所得 6 个阳性对照 (来于第 6 步)     | --          | --           | 各 5.6 $\mu$ L (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管...) |
| 超纯水                        | --          | 5.6 $\mu$ L  | --  |

|                 |     |     |     |
|-----------------|-----|-----|-----|
| 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、RotorGene3000、RotorGene 6000。

9. 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 | 15-30 min               |
| 预变性                 | 95°C | 5 min                   |
| Qrt-PCR 反应 (40 个循环) | 95°C | 15 sec                  |
|                     | 58°C | 1 min, (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：

10. 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。

11. 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。

**所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。**

