



## 鸭瘟病毒探针法 qPCR 试剂盒

Duck Plague Virus Probe qPCR Kit

货号: JLC\_Y7416

使

用

说

明

书

产品及特点

鸭瘟病毒（Duck Plague Virus, DPV）属于疱疹病毒科疱疹病毒属中的滤过性病毒，可感染 48 种以上的雁形目水禽。鸭瘟病毒基因组为双股线状 DNA，全长约为 160 kb。鸭瘟病毒感染后，鸭只会出现食欲不振、呼吸困难、羽毛蓬松等症状，严重的可导致鸭只死亡，使养殖户遭受重大损失，不仅失去鸭只本身的价值，还需承担治疗费用和疫情控制成本。疫情爆发可能导致养殖场停产，进一步中断产业链和降低生产能力，给整个鸭类产业带来巨大冲击。因此快速检测鸭瘟病毒具有重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测鸭瘟病毒的试剂盒，**它具有下列特点：**

- 1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板
- 2. 引物和探针经过优化，分析灵敏度高，可以达到 100 拷贝/反应。
- 3. 提供阳性对照，便于制备标准曲线和用作扩增对照，排除假阴性结果。
- 4. 含识别内源性内参的引物和探针，便于排除 PCR 假阴性样本。
- 5. 特异性高,靶分子的引物和探针是根据鸭瘟病毒 DNA 高度保守区设计,不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
- 6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。
- 7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 PCR 反应。
- 8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

| 成分                                                                                 | 规格     | 包装         |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------|
| 2×Probe qPCR MasterMix                                                             | 500 μL | 0.5 mL 本色管 |
| 荧光 PCR 专用模板稀释液                                                                     | 1 mL   | 1.5 mL 绿盖管 |
| 超纯水                                                                                | 1 mL   | 1.5 mL 蓝盖管 |
| 鸭瘟病毒 qPCR 引物-探针干粉(含内参引物探针)                                                         | 50 次   | 0.5 mL 棕盖管 |
| 鸭瘟病毒 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)                                                          | 50 μL  | 0.5 mL 黄色管 |
| 使用手册                                                                               | 1 份    | 无          |
| 本产品采用五孔盒包装                                                                         |        |            |
| <b>注 意：</b> 引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 220 μL 超纯水充分混匀后得到引物-探针混合液再使用，未用完的需要-20℃保存。 |        |            |

使用方法

**一、稀释标准曲线样品**（以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例）。

- 1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。
- 2. 在各管中加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液。
- 3. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
- 4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
- 5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E4 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
- 6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线阳性样品。放冰上待用。

**二、样品 DNA 的制备**

- 7. 如果有 N 个样品，设置 N+2 个提取，多出的一个是制备 PC（样品制备阳性对照），一个是制备 NC（样品制备阴性对照）。可以用确认是阳性的样本作为阳性对照，用确认是阴性的样本作为阴性对照。
- 8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容，也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

**三、Probe qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）**

- 9. 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（用水做模板），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（直接用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

- 10. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复）：

| 成分 | 样品管 | PCR | 标准曲线样品管 |
|----|-----|-----|---------|
|----|-----|-----|---------|

|                                  | N+2 个   | 阴性对照  | (1-6 管) |
|----------------------------------|---------|-------|---------|
| 2×Probe qPCR MasterMix           | 各 10 μL | 10 μL | 各 10 μL |
| 鸭瘟病毒 PCR 引物-探针混合液(含内参引物探针)       | 各 4 μL  | 4 μL  | 各 4 μL  |
| N+2 个待测样 (含内源性内参)                | 各 6μL   | 不加    | 不加      |
| 超纯水                              | 不加      | 6 μL  | 不加      |
| 第 6 步所得标准曲线样品稀释液<br>(含内参, 1-6 号) | 不加      | 不加    | 各 6 μL  |

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：

| 过程                 | 温度  | 时间                                        |
|--------------------|-----|-------------------------------------------|
| 预变性                | 95℃ | 10 min.                                   |
| PCR 反应<br>(40 个循环) | 95℃ | 15 sec.                                   |
|                    | 60℃ | 1 min (采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 MGB) |

四、数据处理

12. 阴性阳性判断：没有 Ct 读数，或 Ct 大于 40 判为阴性结果。有 Ct 读数，Ct 值小于 40，荧光信号有对数增长，有典型扩增曲线判为阳性结果。每个样本需要对 FAM 通道和 Cy5 通道的结果分别进行判定，得到两个结果。
13. 实验有效性判断：如果扩增阳性对照或制备阳性对照 FAM 通道结果为阴性则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析原因，可能是操作、仪器和试剂三方面的原因，重做扩增或制备或跟仪器和试剂厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照 FAM 通道结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析失败原因，直到污染消除。如果阳性对照和阴性对照正常，则进入下一步分析样本的有效性。
14. 样本有效性判断：如果样本 FAM 通道的结果为阳性，则无论内参 Cy5 通道的结果是阴性还是阳性，样本的结果均有效。如果样本结果为阴性，内参通道结果也为阴性，则此样品的阴性结果无

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              | <p>效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。</p> <p><b>15.</b> 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，分别以阳性对照 FAM 通道和内参 Cy5 通道的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线为斜线，<math>r^2</math> 必须大于 0.95，内参 Cy5 通道读数的标准曲线为一条跟 X 轴平行的横线。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。</p> <p><b>16.</b> 如果用于定性实验，对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 没有读数、或 Ct 大于或等于 40 则均为阴性，如果小于 40 则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的待测样本，如果其对应的内参 Cy5 通道也为阴性，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。</p> |
| <b>自备试剂</b>  | 样品 DNA。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>运输及保存</b> | 低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

**生产企业：上海机纯实业有限公司**

**公司地址：上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603**

**公司电话：021-54720761**

**技术支持：13166274223**