

犬腺病毒 2 型探针法荧光定量 PCR 试剂盒

Canine Adenovirus 2 Probe qPCR Kit

CAT#: BN61610

低温运输, -20℃保存

产品及特点

犬腺病毒 2 型引起犬传染性喉气管炎, 这是一种急性呼吸道传染病。病犬特点是呼吸困难, 咳嗽物中含有出血性的渗出物。潜伏期 5-6 天后, 狗将持续高烧 1-3 天 (39-41℃), 然后严重咳嗽 6-7 天。同时, 狗会出现精神抑郁、食欲不振、呼吸困难、肌肉震颤、浆液性、黏液性或化脓性鼻涕。有些狗可能会呕吐并排出粘液性软便。如果治疗不及时, 很容易与犬副流感病毒等病原体混合感染, 形成较为严重的呼吸道疾病, 即犬瘟热。因此快速准确检测犬腺病毒 2 型对该病的预防和检疫有着重要作用。本产品就是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测犬腺病毒 2 型的试剂盒, 它具有下列特点:

1. 即开即用, 用户只需要提供样品 RNA 模板。
2. 引物和探针经过优化, 分析灵敏性高, 可以达到 100 拷贝/μL。
3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。
4. 特异性高, 引物是根据庚型肝炎病毒 RNA 高度保守区设计, 不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
5. 涵盖性好, 可以扩增庚型肝炎病毒的大多数亚型。
6. 既可用于定性检测, 又可用于定量检测。用于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 20μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	编号	包装
2×Probe PCR MagicMix	60001	500 μL
荧光 PCR 专用模板稀释液	60002	1 mL
超纯水	60003	1 mL
犬腺病毒 2 型 qPCR 引物-探针混合液	61610-4	150 μL
犬腺病毒 2 型 qPCR 阳性对照 (1×10 ⁷ 拷贝/μL)	61610-5	50 μL
使用手册		1 份

本产品仅用于科研

运输及保存	低温运输、-20℃保存，保存期限为 12 个月。
自备试剂	样品 DNA。
使用方法	一、稀释 PCR 阳性对照（以 10E1-10E6 拷贝/μ L 这 6 个 10 倍稀释度为例） 如果做定性实验，则此步可以跳过。如果做定量实验，则需要稀释阳性对照做标准曲线。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 DNA 片段作为阳性对照。 1. 标记 6 个离心管，分别为 6，5，4，3，2，1。 2. 用带芯枪头分别加入 45μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液（最好用带芯枪头，下同）。 3. 在 6 号管中加入 5μ L 1×10E7 拷贝/μ L 的阳性对照（试剂盒提供），充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 拷贝/μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。 4. 换枪头，在 5 号管中加入 5μ L 1×10E6 拷贝/μ L 的阳性对照（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 拷贝/μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。 5. 换枪头，在 4 号管中加入 5μ L 1×10E5 拷贝/μ L 的阳性对照（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 1×10E4 拷贝/μ L 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样品。放冰上用。 二、样品 DNA 的制备 7. 如果有 N 个样品，必须设置 N+2 个提取，多出的一个是样品制备 PC（样品制备阳性对照），一个是样品制备 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10μ L 阳性对照的 10000 倍稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为样品制备 PC。另外用水作为样品制备 NC。 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。 三、Probe qPCR 反应（20μ L 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（用第 4 号管中的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为描述操作步骤，

10. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复。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储存好后最后加）：

成分	样品管 N+2个	PCR阴性 对照管	PCR阳性 对照管（1-6管）
2×Probe qPCR MagicMix	10μ L	10μ L	各10μ L
犬腺病毒2型qPCR引物-探针 混合液	3μ L	3μ L	各3μ L
N+2个待测DNA模板	7μ L	-	-
超纯水	-	7μ L	-
第6步所得标准曲线样品稀 释液（1-6号）	-	-	各7μ L（1号样到1 号管，2号样到2 号管…）

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 qPCR：

过程	温度	时间
预变性	94℃	3 min
PCR反应 （45个循环）	94℃	15 sec
	55℃	30sec（采集FAM通道的荧光信号，淬灭 基团为TAMRA）
	72℃	30sec

四、数据处理

12. 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。

13. 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。若重复结果 Ct 值小于 40，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

关联产品

犬细小病毒探针法 qPCR 检测试剂盒