

犬冠状病毒探针法qRT-PCR试剂盒

Canine Corona Virus Probe qRT-PCR Kit

CAT#:BN61611

低温运输, -20℃保存

产品及特点

犬冠状病毒(canine coronavirus, CCoV) 是单股正链RNA病毒, 是1种严重危害养犬业、经济动物养殖业和野生动物保护的病毒性传染病病原。可使犬发生程度不同的胃肠炎症状, 特征有频繁呕吐、腹泻、沉郁、厌食等症状。本病一年四季均可发生, 以冬季多发, 病犬是主要的传染原, 犬可通过呼吸道、消化道、粪便及污染物传染。该病一旦发生, 同窝犬同室犬很难控制均可造成感染。该病经常和犬细小病毒, 轮状病毒及其它胃肠道疾病混合感染, 幼犬死亡率较高。因此快速检测犬冠状病毒具有重要的意义。本产品就是以探针法qRT-PCR技术为基础开发的专门检测犬冠状病毒RNA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/反应。
3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。
4. 特异性高, 引物是根据犬冠状病毒RNA高度保守区设计, 不会跟其他生物的RNA发生交叉反应。
5. 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各数量级。
6. 本产品足够50次20μL体系的探针法qRT-PCR反应。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分	成分	编号	规格	包装
	探针法qRT-PCR缓冲液	60001	500 μ L	0.5mL
	探针法qRT-PCR酶混合液v2	60002	50 μ L	0.5mL
	荧光PCR模板专用稀释液	60003	1 mL	1.5 mL
	犬冠状病毒qRT-PCR引物-探针干粉	61611-4	50次	1.5mL
	犬冠状病毒qRT-PCR阳性对照(1×10^7 拷贝/ μ L)	61611-5	50 μ L	0.5mL
	使用手册		1份	无
注意：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162uL的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。				
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为24个月。			
自备试剂	样品RNA。			
使用方法	一、稀释标准曲线样品（以$10E1$-$10E6$拷贝/μL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DNA片段作为阳性对照。如果需要RNA阳性样品，需要另外订购。 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45 μL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5 μL 1×10^7拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得1×10^6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 1×10^6拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10^5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 1×10^5拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10^4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样品。放冰上待用。 二、样品RNA的制备 7. 如果有N个样品，最好设置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上步所得4号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次样本制备所要求的起始样本体积一样，以此作为PC。另外用水作为NC。

8. 用自选方法纯化样品的RNA, 本试剂盒跟市场上大多数RNA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 qRT-PCR反应（20μL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RT-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（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RT-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（用水做模板），1个用于RT-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。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	RT-PCR阴 性对照	标准曲线样品管 (1-6管)
探针法qRT-PCR缓冲液	各10 μL	10 μL	各10 μL
探针法qRT-PCR酶混合液v2	各1 μL	1 μL	各1 μL
犬冠状病毒qRT-PCR 引物-探针混合液	各3 μL	3 μL	各3 μL
N+2个待测RNA样本	各6 μL	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 (1-6号)	不加	不加	各6μL (2号样到 2号管, 3号样到 3号管...)

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行RT-PCR：

过程	温度	时间
逆转录	50℃	10 min
预变性	95℃	10 min
PCR反应	95℃	15 sec

(45个循环)	60℃	60 sec (采集FAM通道的荧光信号, 淬灭基团为BHQ)
---------	-----	---------------------------------

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RNA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必须没有读数, 或者大于或等于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40。对待测样品, 如果其Ct没有读数、大于或等于40则均为阴性, 如果小于40则为阳性。