

# 鸽痘病毒探针法 qPCR 试剂盒

## Pigeonpox Virus Probe PCR Kit

目录号: [ml107850](#)

# 使 用 说 明 书

### 产品及特点

本产品是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测鸽痘病毒 (Pigeon- pox Virus, PGPV) 的试剂盒。鸽痘病毒属于痘病毒科脊椎动物痘病毒亚科成员, 为双链 DNA 病毒, 基因组长度为 260 kb ~ 365 kb。鸽痘病毒感染鸽可引起鸽痘, 鸽痘是一种具有较强传染性的病毒性疾病, 发病症状为体表皮肤、眼睑边缘、口腔黏膜、脚爪等部位出现痘疹, 是危害商品鸽养殖的一种重要传染病, 可引起产蛋下降和死亡。 鸽痘一年四季均可发生, 在夏季蚊子多的季节盛行, 各种品种、性别和年龄的鸽均可感染, 但以乳鸽和青年鸽发病, 1 岁以内幼鸽病死率为 5% ~ 60%。鸽痘病毒感染给商品鸽养殖带来巨大危害, 快速检测鸽痘病毒具有重要意义。为此本公司开发了鸽痘病毒探针法 qPCR 试剂盒。本**产品**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，灵敏度高，检测限可达 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，引物是根据鸽痘病毒基因组 DNA 高度保守区设计，不会跟其它生物的 DNA 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 5 个数量级。
6. 本产品足够 50 次 20  $\mu$ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
7. 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 $\mu$ L | 0.5mL 本色盖 |
| 荧光 PCR 专用模板稀释液                                                         | 1mL         | 1.5mL 绿盖管 |
| 超纯水                                                                    | 1mL         | 1.5mL 蓝盖管 |
| 鸽痘病毒 qPCR 引物-探针干粉                                                      | 50 次        | 0.5mL 白盖管 |
| 鸽痘病毒阳性对照(1E7 拷贝/ $\mu$ L)                                              | 50 $\mu$ L  | 0.5mL 黄盖管 |
| 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离心，然后在离心管中加入 165 mL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。 |             |           |

## 使用方法

### 一、稀释标准曲线样品（以 10E1-10E6 拷贝/ $\mu$ L 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。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。

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 $\mu$ L 荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头（下同）。
3. 在 6 号管中加入 5  $\mu$ L 1E7 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡混匀 1 分钟，得到 1E6 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5  $\mu$ L 1E6 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡混匀 1 分钟，得到 1E5 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5  $\mu$ L 1E5 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步所得)，充分震荡混匀 1 分钟，得到 1E4 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 依次重复上面的操作得到 6 个稀释度的标准曲线样品。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 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 上步所得 4 号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 PC。另外用水作为 NC。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品 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、qPCR 反应 (20 $\mu$ 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（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加）：

| 成分                      | 样品管 N+3 个 | PCR 阴性对照 | 标准样品管(1-6 管) |
|-------------------------|-----------|----------|--------------|
| 2×Probe qPCR MasterMix  | 各 10μL    | 10μL     | 各 10μL       |
| 鸽痘病毒 qPCR 引物-探针混合液      | 各 3μL     | 3μL      | 各 3μL        |
| 待测样本 DNA 模板             | 各 7μL     | 不加       | 不加           |
| 超纯水                     | 不加        | 7μL      | 不加           |
| 第 6 步所得标准曲线样品稀释液（1-6 号） | 不加        | 不加       | 各 7μL        |

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℃ | 5min                        |
| PCR 反应   | 95℃ | 15sec                       |
| (45 个循环) | 60℃ | 1min（采集 FAM 通道，淬灭基团为 TAMRA） |

#### 四、数据处理

12. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系，购买新的引物和探针。

13. 如果阴性对照和阳性对照正常，则实验有效，可以进入后续分析。

14. 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。

15. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 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，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 40，则为阴性。如果 Ct 小于 40 则为阳性。

|              |                      |
|--------------|----------------------|
| <b>自备试剂</b>  | 超纯水，样品 DNA。          |
| <b>运输及保存</b> | 低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。 |