

## 猪托克特诺病毒 1 型/细环病毒 19 型双重探针法 qPCR 试剂盒

### TTSuV-1/TTV-19 Duplex Probe qPCR Kit

**目录号: ml104329**

# 使 用 说 明 书

#### 产品及特点

猪托克特诺病毒(Torque Teno Sus Virus, TTSuV)是一种新型环状单链 DNA 病毒, 又称之为猪细环病毒。该病毒广泛存在于不同代次的猪源原代、继代细胞以及正常猪的体内。主要引起发热、精神不振、被毛粗乱、渐进性消瘦, 贫血, 肌肉萎缩, 衰弱无力, 呼吸困难, 咳嗽, 水样下痢或黑便等症状。猪托克特诺病毒 1 型(Torque Teno Sus Virus 1, TTSuV-1)在我国不少地区猪群中广泛流行, 单独感染可引起仔猪出现一定的病理变化, 因此快速检测猪托克特诺病毒 1 型具有重要意义。

细环病毒(Torque Teno Virus, TTV)病毒体近似球形, 直径约 30nm, 无包膜, 其基因组为环状单链反义 DNA, 长约 3.8kb。细环病毒 19 型(Torque Teno Virus 19, TTV-19)是指环病毒科甲型细环病毒属(Alphatorquevirus spp.)的亚种之一。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门对猪托克特诺病毒 1 型/细环病毒 19 型进行检测和分型的试剂盒, **它具有下列特点:**

1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 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，便于排除假阴性结果。
4. 特异性高，引物是根据 TTSuV-1/TTV-19 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 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为 5 个数量级。
6. 两个探针分别用 FAM 和 HEX 标记，检测和分型同时完成。
7. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的探针法荧光定量 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 $\times$ Probe qPCR Master Mix                                                      | 0.5mL      | 0.5mL 本色盖 |
| 荧光 PCR 专用模板稀释液                                                                        | 1mL        | 1.5mL 绿盖管 |
| 超纯水                                                                                   | 50 次       | 1.5mL 棕色管 |
| TTSuV-1/TTV-19 双重 qPCR 引物-探针干粉                                                        | 50 $\mu$ L | 0.5mL 黄盖管 |
| TTSuV-1 qPCR 阳性对照(1 $\times$ 10E7 拷贝/ $\mu$ L)                                        | 50 $\mu$ L | 0.5mL 白盖管 |
| 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短暂离心，然后在离心管中加入 216 uL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20 $^{\circ}$ C保存。 |            |           |

## 使用方法

### 一、稀释 TTSuV-1 检测标准曲线样品（以阳性对照 10E1-10E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度）。

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。

1. 标记 6 个离心管，分别为 A6, A5, A4, A3, A2, A1。
2. 在 A1-A6 号管中各加入 45μL 荧光 PCR 专用模板稀释液。
3. 在 A6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 拷贝/μL 的标准曲线 PC 样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 A5 号管中加入 5 μL 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 A4 号管中加入 5 μL 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E4 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作得到 A1-A6 共六个稀释度的标准曲线阳性样品。放冰上待用。

### 二、稀释 TTV-19 检测标准曲线样品

7. 操作同上，只是使用 TTV-19 的 PC 作为模板。得到 6 个浓度的样本放冰上待用，分别是 B1-B6。

### 二、样品 DNA 的制备

8. 如果有 N 个样品，设置 N+3 个提取，多出的一个是 TTSuV-1 的 PC（样品制备阳性对照），一个是 TTV-19 的 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 第一步和第二步所得的 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟样本制备试剂盒所要求的起始样本体积一样，以此分别作为两个 PC。另外用水作为 NC，水的总体积需要跟样本制备试剂盒所要求的样本体积一样。
9. 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、Probe qPCR 反应 (20 $\mu$ L 体系, 在样品制备室进行)

**10.** 如果做定量分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+3+1+6+6 个 PCR 管, 其中 N+3 个用于上步得到的 N+3 个样品, 1 个用于 qPCR 阴性对照 (用水做模板), 6 个用于 TTSuV-1 的标准曲线, 另外 6 个用于 TTV-19 的标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+3+3 个 qPCR 管, 其中 N+3 个用于上步得到的 N+3 个样品, 1 个用于 RT-PCR 阴性对照 (用水做模板), 1 个用于 TTSuV-1 qPCR 阳性对照, 1 个用于 TTV-19 qPCR 阳性对照 (直接用第一步和第二步所得的两个 4 号稀释液作为模板)。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

**11.** 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加) :

| 成分                                 | 样品管 N+3<br>个 | PCR 阴性<br>对照 | 标曲样品管<br>(A1-A6) | 标曲样品管<br>(B1-B6) |
|------------------------------------|--------------|--------------|------------------|------------------|
| 2×Probe qPCR MasterMix             | 各 10 $\mu$ L | 10 $\mu$ L   | 各 10 $\mu$ L     | 各 10 $\mu$ L     |
| TTSuV-1/TTV-19 双重 qPCR<br>引物-探针混合液 | 各 4 $\mu$ L  | 4 $\mu$ L    | 各 4 $\mu$ L      | 各 4 $\mu$ L      |
| N+3 个待测 DNA 样本                     | 各 6 $\mu$ L  | 不加           | 不加               | 不加               |
| 超纯水                                | 不加           | 6 $\mu$ L    | 不加               | 不加               |
| 第一步所得标准曲线样品稀释液<br>(A1-A6 号)        | 不加           | 不加           | 各 6 $\mu$ L      | 不加               |
| 第二步所得标准曲线样品稀释液<br>(B1-B6 号)        | 不加           | 不加           | 不加               | 各 6 $\mu$ L      |

**12.** 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°C | 5 min  |
| PCR 反应 | 95°C | 15 sec |

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |                                                  |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------------------------------|
|              | (45 个循环)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 60℃ | 30 sec (采集 FAM 通道和 HEX 通道的荧光信号,<br>淬灭基团均为 TAMRA) |
|              | <p><b>四、数据处理</b></p> <p><b>13.</b> 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。</p> <p><b>14.</b> 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。</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 (HEX 通道) 的 Ct 值为纵轴, 绘制标准曲线, 阳性对照的标准曲线为斜线, r2 必须大于 0.95。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照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> 对定性检测, 只判断阳性或阴性, 则阴性对照的 Ct 必须大于 40, 或者没有 Ct 值。阳性对照的荧光信号必须有对数增长, 有典型扩增曲线, Ct 值应该小于 40。对待测样品, 如果其 FAM 通道的 Ct 大于 40 则为 TTSuV-1 阴性, 如果小于或等于 40 则为 TTSuV-1 阳性。如果其 HEX 通道的 Ct 大于 40 则为 TTV-19 阴性, 如果小于或等于 40 则为 TTV-19 阳性</p> |     |                                                  |
| <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 1 年。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |                                                  |