

天
净
沙
系
列

CAT#:15-27200
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

犬冠状病毒探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

Canine Corona Virus (CCoV) Probe qRT-PCR Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 12 号北京市留学人员海淀创业园中关村发展大厦 D405

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点	犬冠状病毒(Canine Corona Virus, CCoV)为单链 RNA 病毒,有 6-7 种多肽,其中 4 种是糖肽,不含 RNA 聚合酶及神经氨酸酶。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。该病一但发生,同窝犬同室犬很难控制均可造成感染。幼犬死亡率较高,对幼犬的危害较大。最近的研究发现 CCoV 感染的宿主范围有不断扩大的趋势,许多野生动物如虎、狮、大熊猫、小熊猫、水貂也可感染。本产品就是以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测犬冠状病毒的试剂盒,它具有下列特点: 1. 即开即用,用户只需要提供样品 RNA 模板。 2. 引物和探针经过优化,灵敏性高。 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高度保守区设计,不会跟其他病毒的 RNA 发生交叉反应。 5. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 RT-PCR 反应。 6. 本产品只能用于科研。		
规格及成分	成分	编号	十孔盒包装
	探针法 qRT-PCR 缓冲液	190504a	500 μ L (黄盖)
	探针法 qRT-PCR 酶混合液	190504b	100 μ L (红盖)
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (黄盖)
	犬冠状病毒探针法 qRT-PCR 引物混合液	15-27200yw	100 μ L (白盖)
	犬冠状病毒 qRT-PCR 探针	15-27200pb	50 μ L (棕色管)
	犬冠状病毒探针法 qRT-PCR 阳性对照(1 $\times$ 10E8 拷贝/ μ L)	60908-27200pc	50 μ L (黄盖)
	使用手册	15-27200sc	1 份
运输及保存	低温运输, -20 $^{\circ}$ C 保存, 保存期限为 12 个月。		
自备试剂	样品 RNA。		

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以 10E2-10E7 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。

1. 标记 6 个离心管，分别为 7，6，5，4，3，2。
2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 RT-PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。
3. 在 7 号管中加入 5 μL 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E7 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 5 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。
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 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 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病毒 RNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的柱式病毒 RNAout。其使用手册可从本公司网站 www.tiandz.com 通过搜索产品名称或产品编号 71001-50 下载。

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 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 管	标准曲线 样品管 (2-7 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	各 2 μL	2 μL	各 2 μL												
	犬冠状病毒 qRT-PCR 探针	各 1 μL	1 μL	各 1 μL												
	犬冠状病毒探针法 qRT-PCR 引物 混合液	各 2 μL	2 μL	各 2 μL												
	待测样品 RNA 模板	各 5 μL	-	-												
	超纯水	-	5 μL	-												
	第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)	-	-	各 5 μL (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 qRT-PCR:																
		<table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>逆转录</td><td>50℃</td><td>30 min</td></tr><tr><td>预变性</td><td>94℃</td><td>10 min</td></tr><tr><td rowspan="2">qRT-PCR 反应 (40 个循环)</td><td>94℃</td><td>15 sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>1 min (采集 FAM 通道的荧光信号)</td></tr></table>	过程	温度	时间	逆转录	50℃	30 min	预变性	94℃	10 min	qRT-PCR 反应 (40 个循环)	94℃	15 sec	60℃	1 min (采集 FAM 通道的荧光信号)
过程	温度	时间														
逆转录	50℃	30 min														
预变性	94℃	10 min														
qRT-PCR 反应 (40 个循环)	94℃	15 sec														
	60℃	1 min (采集 FAM 通道的荧光信号)														
五、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。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性，如果小于 35，则为阳性。																
关联产品	犬冠状病毒可视化 LAMP 检测试剂盒															