

# 新城疫病毒探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

## Newcastle Disease Virus Probe qRT-PCR Kit

目录号: [ml107416](#)

# 使 用 说 明 书

### 产品及特点

新城疫病毒(Newcastle Disease Virus, NDV), 也叫禽副粘病毒 1 型, 属于副黏病毒科禽副黏病毒属。新城疫病毒是 ssRNA 病毒, 有包膜, 病毒颗粒具多形性, 有圆形、椭圆形和长杆状等, 成熟的病毒粒子直径 100 ~ 400nm。新城疫病毒对外界环境的抵抗力较强, 55°C作用 45min 和直射阳光下作用 30min 才被灭活。病毒在 4°C中存放几周, 在-20°C中存放几个月或在-70°C中存放几年, 其感染力均不受影响。新城疫是由新城疫病毒中强毒株引起禽的一种高度接触性染病, 以高热、呼吸困难、下痢、神经紊乱、黏膜和浆膜出血为特征, 具有很高的发病率和病死率, 是危害养禽业的一种主要传染病。世界动物卫生组织将其列为法定报告疫病, 我国将其列为一类进境动物疫病。因此对新城疫病毒的快速灵敏诊断具有重要意义。本产品以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测新城疫病毒的试剂盒, **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，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/ $\mu\text{L}$ 。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据新城疫病毒 RNA 高度保守区设计，不会跟其他的 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 个数量级。
6. 本产品足够 50 次 20 $\mu\text{L}$  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	规格	包装
探针法 qRT-PCR 缓冲液	0.5mL	0.5mL 蓝盖管
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	50 $\mu\text{L}$	0.5mL 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
超纯水	1mL	1.5 mL 蓝盖管
新城疫病毒 qRT-PCR 引物-探针干粉	50 次	1.5mL 棕色管
新城疫病毒 qRT-PCR 阳性对照( $1 \times 10^7$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ )	50 $\mu\text{L}$	0.5mL 黄盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用五孔盒包装		
<p><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 162<math>\mu\text{L}</math> 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20<math>^{\circ}\text{C}</math>保存。</p>		

### 使用方法

- 一、**稀释标准曲线样品** (以  $10^1$ - $10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  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)。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 45 $\mu$ 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 5 $\mu$ L  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^6$  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  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^5$  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  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu$ 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 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 10 $\mu$ 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 RNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒 RNA 提取试剂盒兼容。

## 三、设置 qRT-PCR 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)，5 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 (用试剂盒提供的阳性对照的 10000 倍稀释液做模板)。

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	PCR 阴性对照	标准曲线样品管(1-6 管)
----	-----------	----------	----------------

探针法 qRT-PCR 缓冲液	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	各 10 $\mu$ L
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	各 2 $\mu$ L
新城疫病毒探针法 qRT-PCR 引物-探针混合液	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L	各 3 $\mu$ L
N+2 个待测 RNA 样本	5 $\mu$ L	不加	不加
超纯水	不加	5 $\mu$ L	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 5 $\mu$ L

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 $^{\circ}$ C	15min
预变性	95 $^{\circ}$ C	5min
PCR 反应 (40 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15sec
	60 $^{\circ}$ C	60sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 BHQ1)

#### 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 RNA 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 35。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 35，否则实验无效。如果实验有效，

	则分析待测样品，若无 Ct 或 Ct 大于或等于 35，则为阴性。如果 Ct 小于 35 则为阳性。
<b>自备试剂</b>	样品 RNA，超纯水。
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。