单重提取扩增荧光定量 PCR 试剂组分说明书

[产品货号] P783

[包装规格] 50 头份/盒

[预期用途] 适用于组织及血清等样本中的猪流行性腹泻病毒核酸进行检测。

[主要组成成分]

序号	名称	规格
1	RT-qPCR 反应液	1140 μl
2	RT-qPCR 酶混合液	55 μl
3	猪腹泻 RT-qPCR 引物探针	140 μl
4	猪腹泻 RT-qPCR 阳性对照	100 μl
5	RT-qPCR 阴性对照	1000 μl

[储存条件及有效期] 试剂储存于(-30～-15)℃，≤0℃运输，有效期为 12 个月。

[适用仪器] ABI7500、罗氏 96/480、安捷伦、伯乐、国产博日、宏石等各种荧光定量 PCR 仪。

[操作步骤]

1. 核酸提取：

使用商品化的病毒核酸提取试剂盒进行样本处理，提取得到的核酸取**2 μl**作为PCR模板用。推荐使用济凡生物科技（常州）有限公司的“Fine Quick快速病毒DNA/RNA离心柱法提取试剂盒（货号D501）”或者“FineMag 快速磁珠法病毒DNA/RNA提取试剂盒（货号Y503系列,需配合自动化核酸提取纯化仪）”

2. 扩增试剂配制：

根据“待检样本数+阳性对照+阴性对照+1=应测试数 N”，按照下表比例配制扩增试剂：

试剂组分	扩增试剂配制方法
RT-qPCR反应液	19.5 μl×N
RT-qPCR酶混合液	1 μl×N
猪腹泻RT-qPCR引物探针	2.5 μl×N
模板	2 μl×N
总量	25 μl×N

反应液按照每管 **23 μl** 分装，然后加入提取好的样本模板和设阴、阳性对照（**2 μl**），加完样品后盖上盖子再瞬时离心，上机检测。

3. 反应程序设定：

按照下表进行 PCR 仪程序设定；荧光检测通道选择：选择 FAM 通道（Reporter：FAM）检测；具体检测通道设置可参照各仪器使用说明。

步骤	温度	时间	循环数
1	50 ℃	10 min	1 cycle
2	95 ℃	3 min	1 cycle
3	95℃	10 sec	5 cycles
	62℃	30 sec	
	72℃	30 sec	
4	95 ℃	10 sec	40 cycles
	55℃（此步收集荧光）	30sec	

[检测结果的质量标准及判定]

分析条件设置：阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。

如果阳性对照扩增曲线有明显对数扩增曲线，且 Ct 值≤30，阴性对照扩增曲线无 Ct 值显示，二者均成立才可判定试验成立，否则试验无效。

1) 如果检测样本 Ct 值≤30，报告为猪流行性腹泻病毒核酸阳性。

2) 如果检测样本 30＜Ct 值≤35 时为可疑，需重新对样本裂解处理进行检测，如仍为可疑，则判为阳性；若重复检测 Ct 值＞35，则判为阴性。

仅供科研

3) 如果检测样本的 Ct 值＞35 或者无数值，则判为阴性。

[注意事项]

（1）开始检测前请仔细阅读本说明书，按要求操作。

（2）组织样品的前期处理和核酸扩增应注意生物安全。

（3）试剂使用前，应充分融化均匀后，瞬时离心。

（4）加样时应使样品完全落入反应液中，不应有样品黏附于管壁上，加样后应尽快压紧管盖。

（5）核酸反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各荧光定量 PCR 反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。

（6）PCR 体系配制与分装等操作应在冰上进行。

（7）经样品裂解液处理过的样本，不能用于样本保存，仅用于即时检测。

（8）研磨时不可使用金属转头，以保证结果的准确性。

（9）研磨组织样本不宜过大，以防杂质含量太高而抑制后续的 PCR 反应。

仅供科研