

GNM 牛病毒性腹泻病毒（BVDV）检测试剂盒 说明书

货 号:

HCD0309-050(50T)

一、试剂盒简介

GNM 牛病毒性腹泻病毒BVDV 检测试剂盒（双重RT-qPCR-荧光探针法）是基于荧光探针法的qPCR 技术，用于检测牛病毒性腹泻病毒（BovineViralDiarrheaVirus，BVDV）。对需要检测 BVDV 病毒污染的生物制品（如细胞库、病毒种子批、牛血清等）进行快速检测。本试剂盒特异性强，灵敏度高，最低检测限可达 10copies/ 反应，与工程细胞（CHO、293T、MDCK、VERO、NS0、Sf9），工程菌（大肠杆菌、毕赤酵母）和牛、猪、犬基因组等无交叉反应干扰。试剂盒内含内参 IC，能够判别待测样本对于扩增反应是否存在抑制，以规避 假阴性结果的产生；也可在样品提取时添加内参 IC，从而对提取效果予以监测，

本试剂盒建议与本公司的**病毒核酸提取纯化试剂盒(磁珠法)**试剂搭配使用。

本试剂盒采用了 dUTP/UDG 防污染系统，能够防止假阳性结果的出现，有力保证了结果的准确性。

二、储存条件及有效期

1. 在避光-20±5℃条件下储存，有效期 12 个月。
2. 泡沫盒/箱加干冰或冰盒运输，开瓶后避光-20±5℃储存。
3. 产品批号，生产日期见外包装盒。

三、试剂盒规格及组分

组分名称	HCD0309-050 (50T)	保存
2×RT-qPCR Reaction Buffer	800μL	-20±5℃
BVDV Pri/Pro Mix	200μL	-20±5℃，避光
内部质控（BVDV IC）	100μL	-20±5℃
阳性质控（BVDVPC）	100μL	-20±5℃
DNA 稀释液	1.5mL×2	-20±5℃

四、适用机型（包括但不限于）

ABI 7500 Real-Time PCR System

SLAN-96P/S 全自动医用 PCR 分析系统

五、相关设备耗材

一次性无尘手套、1.5ml 无菌低吸附离心管、qPCR 专用无菌无酶八联排管或 96 孔板、1000μL、100μL、10μL 移液器和无菌低吸附带滤芯枪头、荧光定量 PCR 仪、掌式离心机、涡旋混匀仪。

六、检测方法

实验流程

1. 待测样本的 DNA 准备

1.1 建议配套使用本公司“病毒核酸提取纯化试剂盒(磁珠法)”，提取样本 DNA。

1.2 将试剂盒放置 2~8℃冰箱或冰上融化，涡旋混匀，瞬时离心。

2. qPCR 反应体系的准备

2.1 根据所要检测的样本数量，计算所需反应孔数，一般每个样本做 2 个重复孔。

反应孔数=（1 个阳性质控 PC+1 个无模板对照 NTC+1 个提取阳性对照 PCS +1 个提取阴性对照 NCS+N 个待测样品）×2

2.2 将所需试剂放置冰上融化，根据反应孔数计算所需要反应混合液的总量。

$$\text{反应混合液总量} = (\text{反应孔数} + 2) \times 20 \quad (2 \text{ 为损失孔数})$$

按以下方案配置反应混合液。

表 1 反应混合液配置

组分	单孔用量/μL
2×RT-qPCR Reaction Buffer	15
BVDV Pri/Pro Mix	4
内部质控（BVDV IC）	1
总体积	20

*若提取时未加入 IC，则按表 1 配置反应混合液；若提取时加入 IC，则在反应混合液中使用 DNA 稀释液替代 IC。

3. 加样

充分旋涡混匀反应混合液，向每个反应孔加入 20μL 反应混合液及 10μL 待测核酸样品，如表 2 所示。

表 2 加样示例

反应孔	加样示例	反应孔体积
阳性质控 PC	20μL 反应混合液+10μL 阳性质控	30μL
无模板对照 NTC	20μL 反应混合液+10μL DNA 稀释液	30μL
提取阳性对照 PCS	20μL 反应混合液+10μL PCS 纯化液	30μL
提取阴性对照 NCS	20μL 反应混合液+10μL NCS 纯化液	30μL
待测样品	20μL 反应混合液+10μL 待测样品纯化液	30μL

注：①PCS 纯化液可使用 10μL PC+90μL 样品空白buffer（或者 1×PBS）作为样品进行前处理获得，或根据实验室情况调整；

②NCS 纯化液可使用 DNA 稀释液作为样品进行前处理获得。

表 3 96 孔排版示例

A									NCS	NCS	
B				S1	S1						
C				S2	S2						
D				S3	S3				PCS	PCS	
E				S4	S4						
F				S5	S5						
G									NTC	NTC	
H											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

4. qPCR 程序设置

以 ABI7500 为例：

4.1 新建实验，选择“Absolute Quantification”；

4.2 输入实验名称，选择 Quantitation-Standard Curve，TaqMan reagents 和 Standard 模式；

4.3 选择报告荧光基团，牛病毒性腹泻病毒通道荧光基团为 FAM，猝灭基团为 None；IC 通道荧光基团为 VIC，猝灭基团为 None；参比荧光为 ROX；

4.4 设置 qPCR 反应程序为两步法：

表 4 RT-qPCR 反应程序

阶段	温度	时间	循环数
逆转录	50℃	10min	1
预变性	94℃	3min	1
循环 1	92℃	15s	5
	45℃	30s	
	72℃	1min	
循环 2	92℃	10s	40
	56℃	1min	

反应体积选择 30μL，开始运行。

各实验室可根据所用机型进行设置反应程序。

结果分析

以 ABI7500, 软件版本 2.4 为例:

1. 分析设定

- 1.1 推荐阈值 (Threshold=0.2), 亦可采用自动阈值。如需手动调整, 阈值线要高于阴性对照或者基线噪音, 通常设置在样本重复性较好的指数增长期的后期, 不同通道需要设置各自独立、合适的阈值线。
- 1.2 基线通常采用自动基线。如需手动调整, 基线起始循环数选择在指数增长期之前, 起点需避开起始荧光采集的波动区, 终点选择在最早出现指数扩增样本的 Ct 值的前 1~2 个循环。

2. 结果判定

2.1 PC、NTC、PCS、NCS 结果判定参考如表 7。

表 5 质控结果分析

质控样品	FAM 信号	VIC 信号
PC	Ct<30, 且有明显的扩增曲线	Ct<30, 且有明显的扩增曲线
NTC	Ct≥37, 或无明显扩增曲线	Ct<30, 且有明显的扩增曲线
PCS	Ct<30, 且有明显的扩增曲线	Ct<30, 且有明显的扩增曲线
NCS	Ct≥37, 或无明显扩增曲线	Ct<30, 且有明显的扩增曲线

注: 质控结果判定标准, 可依据各实验室的检测限验证结果考虑。

2.2 待测样品检测结果判断, 参考表 8。

表 6 待测样品结果分析

FAM 信号	VIC 信号	结果判定
Ct<37 且有明显扩增曲线	Ct<30, 且有明显的扩增曲线	阳性
	Ct≥30, 或无明显扩增曲线	阳性, 有抑制
Ct≥37, 或无明显扩增曲线	Ct<30, 且有明显的扩增曲线	阴性
	Ct≥30, 或无明显的扩增曲线	无法判断, 有抑制

注: 若出现有抑制的情况, 需重新测试或对样品进行合适处理消除抑制因子。

七、注意事项

1. 本试剂盒仅供科研使用，不用于临床诊断。
2. 本试剂盒需严格按照说明书操作步骤使用，以保证最佳的检测结果。
3. 提取阳性对照 PCS，可以加入 10 μ L PC+90 μ L 样品空白buffer（或者 1 $\times$ PBS）作为样本提取，或根据实验室情况调整。
4. IC 通道荧光可以根据实验室情况选择是否收集及后期数据处理。
5. 试剂盒组分建议在低温下融化使用。
6. 建议使用带滤芯吸头。

八、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。