

GNM 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)检测试剂盒 (双重 qPCR-荧光探针法) 说明书

货 号:

HCD0308-050(50T)



一、试剂盒简介

苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒（AcMNPV）检测试剂盒是一款专为检测杆状病毒表达系统来源的基因工程疫苗中残留的杆状病毒（AcNPV）DNA 而设计的的专用试剂盒，也可用于纯化工艺病毒清除验证。

本试剂盒采用了双重 qPCR 荧光探针技术，定量检测样品中 AcMNPV 残留 DNA。检测快速、灵敏度高、特异性强，最低检测限可以达到 10copies/反应。试剂盒配套有 AcMNPV 定量参考品，准确度高。本试剂盒包含有外源性靶标的引物、探针和模板，通过外源性靶标检测结果来监测样本提取及试剂配制过程，避免假阴性结果。

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)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	HCD0308-050 (50T)	保存
2×qPCR Reaction Buffer	800μL	-20±5℃
ACMNPV Pri/Pro Mix	250μL	-20±5℃，避光
内部质控（ACMNPV IC）	100μL	-20±5℃
阳性质控（ACMNPV PC）	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。

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

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×qPCR Reaction Buffer	15
ACMNPV Pri/Pro Mix	4
内部质控 (ACMNPV 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 20 μL 反应混合液及 10 μL 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	20 μL 反应混合液+10 μL 阳性质控	30 μL
无模板对照 NTC	20 μL 反应混合液+10 μL DNA 稀释液	30 μL
提取阳性对照 PCS	20 μL 反应混合液+10 μL PCS 纯化液	30 μL
提取阴性对照 NCS	20 μL 反应混合液+10 μL NCS 纯化液	30 μL
待测样品	20 μL 反应混合液+10 μL 待测样品纯化液	30 μL

注：①PCS 纯化液可使用 10 μL PC+90 μL 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，苜蓿银纹夜蛾核型多角体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 qPCR 反应程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95°C	10min	1
循环	95°C	15s	40
	60°C	30s	

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。