

### 【产品名称】

牛源病毒（BVDV/REO-3/BPIV-3/BPV-3/BAV-3）核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

货号：BP-QN32-50

### 【包装规格】

50 Reactions/盒

### 【预期用途】

本试剂盒用于定性检测动物源性原辅料、细胞库、病毒种子库、未加工收获液和最终产品等各种生物材料中是否有 5 种牛源性病毒污染。

牛源病毒名称	缩写	英文全称
牛病毒性腹泻病毒	BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus
呼肠孤病毒 3 型	REO-3	Reovirus 3
牛副流感病毒 3 型	BPIV-3	Bovine Parainfluenza 3 Virus
牛细小病毒 3 型	BPV-3	Bovine Parvovirus 3
牛腺病毒 3 型	BAV-3	Bovine Adenovirus type 3

### 【产品简介】

本试剂盒利用 PCR-荧光探针法，针对 5 种牛源性病毒序列保守区域设计特异性引物探针。具有操作简便，检测快速，特异性强，灵敏度高的特点。

内标 (IC) 可在样品提取阶段加入，以评估提取效果；也可在 PCR 扩增反应阶段加入，以监控扩增反应是否存在抑制，防止假阴性结果的产生。本试剂盒含有 UDG 酶，用于预防扩增产物的污染。

本试剂盒与珠海横琴宝锐核酸提取或纯化试剂盒 I (磁珠法) 配套使用，高效提取样品中的 5 种牛源性病毒核酸，检测限可达到 1copy/μL。

### 【主要成分与含量】

试剂盒中含有如下组分：

试剂盒组分	规格 (50 Reactions/盒)
BV RNA PCR Buffer	0.9mL×1 管
BV RNA Enzyme MIX	0.1mL×1 管
BV DNA PCR MIX	1.0mL×1 管
BV 阳性对照	1.5mL×2 管
BV 阴性对照	1.5mL×2 管
BV 内标	0.5mL×1 管
说明书	1 份

说明：

不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

实验操作中需要但试剂盒中未提供的试剂：核酸提取或纯化试剂盒。

### 【储存条件及有效期】

1、试剂盒子于≤-20°C 避光储存，有效期为 24 个月。

2、试剂盒避免反复冻融，冻融次数不宜超过 7 次。

3、产品批号及有效期：见产品外包装。

#### 【适用机型】

包括但不限于以下机型：SLAN-96P、SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统；ABI7500、ABI QuantStudio™ 5 实时荧光定量 PCR 仪；Roche LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪；伯乐 CFX96 定量 PCR 仪。

#### 【相关设备】

超净工作台或生物安全柜、掌上离心机、涡旋混匀仪、荧光定量 PCR 仪、不同规格的移液器。

#### 【检验方法】

##### 1. 实验前准备

注意实验环境的控制，建议尽量在超净工作台或生物安全柜中进行实验操作，工作台面、移液枪及离心管架用紫外照射 30min 后，用 75% 酒精喷洒并擦干。

##### 2. 试剂准备

从试剂盒中取出 BV RNA PCR Buffer、BV RNA Enzyme MIX、BV DNA PCR MIX、BV 内标、BV 阴性对照、BV 阳性对照，置于室温融化，充分震荡混匀后瞬时离心备用。

##### 2.1 RNA 检测试剂的准备

根据所要检测样品的数量，每个样品做 2 个重复孔，计算所需反应孔数  $N = (样品数 + 1 \text{ 个无模板对照 NTC} + 1 \text{ 个阴性对照 NCS} + 1 \text{ 个阳性对照 PC} + 1 \text{ 个阳性对照样本 PCS}) \times 2$ 。

单孔 RNA 反应体系 =  $18\mu\text{L BV RNA PCR Buffer} + 2\mu\text{L BV RNA Enzyme MIX}$ ，配制 RNA 扩增试剂总量为  $N + 2$  孔（含 2 孔损失量），根据计算的检测数量配制 RNA 反应体系，将相应数量的 RNA 反应体系，按照每孔  $20 \mu\text{L}$  的量分装至 96 孔 PCR 板或者 PCR 八连管中。

##### 2.2 DNA 检测试剂的准备

根据计算的检测数量，将相应数量的 BV DNA PCR MIX，按照每孔  $20\mu\text{L}$  的量分装至 96 孔 PCR 板或者 PCR 八连管中。

##### 3. 核酸提取纯化

使用核酸提取或纯化试剂盒对阴性对照，阳性对照，待测样本进行核酸的提取纯化，操作步骤参照核酸提取或纯化试剂盒说明书，内标加样量为  $10\mu\text{L}$ ，样本量为  $200\mu\text{L}$ 。牛血清、细胞基质样本可直接进行提取纯化，高浓度细胞样本建议离心取上清，特殊类型基质样本建议咨询宝锐生物技术支持。

##### 4. 扩增和检测

4.1 按照  $20\mu\text{L}/\text{管}$  分装量将分别将 BV RNA 反应体系和 BV DNA PCR MIX 分装至反应管后，按下列表格分别加入无模板对照、阳性对照、阴性对照纯化液、阳性对照纯化液、待测样品纯化液：

RNA 组分	单孔用量 ( $\mu\text{L}$ )	DNA 组分	单孔用量 ( $\mu\text{L}$ )
BV RNA 反应体系	20	BV DNA PCR MIX	20
模板	20	模板	20
总体积	40	总体积	40

\*若不使用试剂盒内标功能，提取时无需添加内标，程序设置时不设置 ROX 通道，结果分析时无需关注 ROX 结果。

\*若样品提取时未添加内标，扩增时加内标，则配制 MIX 时每反应液加 1 $\mu$ L 内标，分装扩增试剂时分装 21 $\mu$ L/反应，此时 PCR 总反应体积为 41 $\mu$ L/反应。

#### 4.2 孔板排版布局可参考下表：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC		S1	S1		PC	PC		S1	S1		NTC
B	NTC		S2	S2		PC	PC		S2	S2		NTC
C			S3	S3					S3	S3		
D			S4	S4					S4	S4		
E			S5	S5					S5	S5		
F			S6	S6					S6	S6		
G	NCS		S7	S7		PCS	PCS		S7	S7		NCS
H	NCS		S8	S8		PCS	PCS		S8	S8		NCS

\*该示例表示的是检测 1 个无模板对照 NTC、1 个阴性对照样本 NCS、1 个阳性对照 PC、1 个阳性对照样品 PCS、8 个待测样品，每个检测做 2 个复孔，1-6 列为 RNA 检测，7-12 列为 DNA 检测。

\*实际检测时可根据样品多少，参照此示例进行排版布局。

4.3 将上述配制好的反应液，盖好反应管盖，混匀后瞬时离心，转移到荧光 PCR 仪器上。

4.4 将反应管放置在荧光 PCR 仪样品槽中，在荧光 PCR 仪上运行以下程序（DNA 和 RNA 检测程序相同）：

步骤	条件	循环数
UDG 处理	25°C: 2 分钟	1
反转录	50°C: 15 分钟	1
预变性	95°C: 3 分钟	1
PCR 扩增	95°C: 10 秒, 60°C (采集荧光) : 30 秒	45

荧光通道选择 FAM、VIC、CY5、ROX，其中 FAM、VIC（DNA 反应体系无此通道，无需关注该通道检测结果）、CY5 为靶标基因，ROX 为内标基因。若仪器为 ABI 系列时，参比荧光选择 none，DNA 反应体系无需选择 VIC 通道。TaqMan 探针报告基团：

报告基团	DNA 反应体系检测目标	RNA 反应体系检测目标
FAM	BPV-3	REO-3
VIC	无此通道，无需关注该通道检测结果	BPIV-3
CY5	BAV-3	BVDV
ROX	IC	IC

#### 5. 结果判定

##### 5.1 阈值线的设定

阈值线依据仪器噪声情况进行调整，将阈值线设置到超过本底信号波动位置。若需要手动调节，以刚好超过阴性对照品扩增曲线的最高点为准。阈值线设定应基于实验室验证数据，以满足检测限要求为基准。

##### 5.2 实验成立条件

质控样品	靶标信号 (FAM/VIC/CY5)	内标信号

NTC	2 复孔 $Ct \geq 40$ 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 $Ct < 35$ 且有效的“S”型扩增
NCS	2 复孔 $Ct \geq 40$ 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 $Ct < 35$ 且有效的“S”型扩增
PCS	2 复孔 $Ct < 35$ 且有效的“S”型扩增	2 复孔 $Ct < 35$ 且有效的“S”型扩增
PC	2 复孔 $Ct < 35$ 且有效的“S”型扩增	2 复孔 $Ct < 35$ 且有效的“S”型扩增

\*质控标准应基于实验室验证数据，以满足检测限要求为基准。

### 5.3 结果判定

靶标信号 (FAM/VIC/CY5)	内标信号	结果判断
2 复孔有 1 孔以上 $Ct < 40$ 且有效的“S”型扩增	2 复孔 $Ct < 35$ 且有效的“S”型扩增	阳性
	2 复孔 $Ct \geq 35$ 或扩增曲线无明显起峰	阳性，有抑制
2 复孔 $Ct \geq 40$ 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 $Ct < 35$ 且有效的“S”型扩增	阴性
	2 复孔 $Ct \geq 35$ 或扩增曲线无明显起峰	阴阳性无法判断，有抑制

\*ROX 信号如果有抑制，需重测或查找并排除抑制因子。

\*DNA 检测体系未添加 VIC 信号，由于不同通道间信号的影响，可能导致该通道有异常曲线，无需关注该通道检测结果。

#### 【注意事项】

- 1、试剂盒应在-20°C以下保存。
- 2、实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按照操作步骤执行，在操作过程中对时间、试剂体积等精确控制可以获得最好的结果。
- 3、核酸提取有关耗材确保洁净、无 DNase/RNase，提取过程尽量快速，完成后进入下一步实验或冷冻保存。
- 4、不要使用过期组分或者不同批次组分混合使用。
- 5、冻存试剂使用前应于室温下完全融化，瞬时离心使液体完全沉于管底。避免反复冻融，以免影响试剂性能。
- 6、要带新的一次性 PE 手套对反应管封盖，避免徒手或使用过的手套接触反应管，检测过程中使用不带荧光物质一次性无粉乳胶手套。
- 7、实验室应严格按照有关规定分区管理，依照配液区→模板提取区→扩增区→分析区顺序进行基因检测。各区间人员、器材、试剂及空气流向应有严格要求。
- 8、样品、校准品等在使用后及时封盖，避免组分间及气溶胶等的污染造成假阳性。
- 9、扩增产物禁止开盖，实验产生的废弃物应及时收集，远离 PCR 实验室进行无害化处理。
- 10、如果样本中靶标为强阳性时，由于体系的竞争抑制，可能会对内标检测造成影响。

#### 【免责声明】

在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

#### 【公司信息】

邮箱：marketing@biori.com.cn

网址：www.biori.com

