天净沙系列

CAT#:13-55700

低温运输，-20℃保存

传染性胰脏坏死病病毒电泳法 RT-PCR 试剂盒

Infectious Pancreatic Necrosis Virus RT-PCR Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

传染性胰脏坏死病病毒（infectious pancreatic necrosis，IPN）是鲑科鱼类的一种高度传染性的急性病毒性疾病。该病广泛流行于北美、欧洲和亚洲各国，是世界性鱼病，该病毒主要危害鲑科鱼类开始摄食的鱼苗至 3 个月的稚鱼，20 周龄以后的鱼种一般不发病，但可成为终身带毒者。发病最适水温为 10～15℃，10℃以下或 15℃以上较少发病或病情轻、死亡率低。该病可经水体水平传播，也可经卵垂直传播；病后存活个体可带毒数年，并通过粪便、鱼卵、精液排出病毒，继续传播。本产品就是为满足此需求而开发的、专门检测传染性胰脏坏死病病毒的常规 RT-PCR 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. 产品经过精心优化，分析灵敏性能到达 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据传染性胰脏坏死病病毒 RNA 高度保守区设计，只能检测传染性胰脏坏死病病毒，不会跟除此之外的其他生物的 RNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的 RT-PCR 反应。
6. 本产品只能用于定性实验，不能用于定量实验。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装
2×RT-PCR Buffer	91202a	500 μL	0.5 mL 绿盖管
10×RT-PCR 酶混合液	91202b	50 μL	0.5 mL 红盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 引物干粉	yw15-55700af	50 次	0.5 mL 白盖管
传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc55700-MH562041	250 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	13-55700sc	1 份	1 份

注意： 1、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 110 μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存

2、为避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供专一的 DNA 片段作为阳性对照。如果需要 RNA 片段作为阳性对照的需要单独定制。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备试剂	样品 RNA
使用方法	**一、样品 RNA 的制备** 1. 如果有 N 个样品，必须设置 N+2 个提取反应，多出的两个中一个是 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10 μL 试剂盒提供的 RT-PCR 阳性对照（1E4 拷贝/μL）再加上一定量的水作为制备的阳性对照，加水后其总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样品体积一样。可以用水作为制备的阴性对照。 2. 用自选方法纯化上述 N+2 个样品的 RNA。本试剂盒跟市场上大多数样品 RNA 提取试剂盒兼容，也可以选用本公司的相关的核酸提取试剂盒。 **二、设置 RT-PCR 反应（20 μL 体系）** 3. 标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 RNA 样品，额外增加的两个管一个用于 RT-PCR 阳性对照，另一个用于 RT-PCR 阴性对照。按照下表在各 PCR 管中加入下列成分：

成份	N+2 个 样品管	RT-PCR 阴性对照	RT-PCR 阳性对照
2×RT-PCR Buffer	各 10 μL	10 μL	10 μL
10×RT-PCR 酶混合液	1 μL	1 μL	1 μL
传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 引物混合液	各 2 μL	2 μL	2 μL
制备的 N+2 个 RNA 样品	各 7 μL	不加	不加
超纯水	不加	7 μL	不加
传染性胰脏坏死病病毒 RT-PCR 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	7 μL

4. 上机进行 RT-PCR，RT-PCR 反应参数为:

过程	**温度**	**时间**
逆转录	50℃	10 分钟
预变性	95℃	5 分钟
PCR 反应 (32 个循环)	95℃	15 秒
	58℃	20 秒
	72℃	30 秒
延伸	72℃	10 分钟

三、电泳分析

5. 取 10 μL 扩增产物进行常规琼脂糖电泳，检测扩增效果，由于扩增产物较短，

	建议用 1.5%-2.0%的琼脂糖凝胶。 6. 阳性样品预期得到的扩增产物长度为 164 bp。如果两个阴性对照（样品制备阴性对照或 RT-PCR 阴性对照）有此扩增产物，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析实验结果。 7. 如果所有样品和 RT-PCR 阳性对照均无此扩增产物，则说明有系统性的问题（试剂，设备，程序，操作等），需要重复并排查原因。 8. 如果没有上述两种情况，则实验有效，可以分析样品的扩增结果。N+2 个样品中扩增产物的判断为阳性，无则判定为阴性。
关联产品	传染性胰脏坏死病病毒病毒可视化染料-荧光染料 RT-LAMP 试剂盒