天净沙系列

CAT#:17-35100-GB

低温运输，-20℃保存

天净沙

伪狂犬病病毒含内参探针法 PCR 检测试剂盒（国标 GB/T 35911-2018）

使用手册 V0.5

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

本产品根据 2018 年中国国标文件 GB/T 35911-2018 开发，专门用于检测伪狂犬病病毒（Pseudorabies Virus，PRV）。它具有下列特点：

1. 根据中国国标开发，达到合规要求。
2. 即开即用，用户只需要提供待测样本。
3. 本产品不包括 DNA-RNA 病毒纯化试剂盒和步骤，有需要可另购我司相关产品。
4. 本产品提供满足 2018 年中国国标要求的伪狂犬病病毒 PCR 引物、探针和质粒标准品。但本试剂不提供灭活的伪狂犬病病毒。
5. 本产品足够 50 次 50 μL 体系的探针法 PCR 反应
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用大扁盒包装

成分	编号	规格	包装材料
10× PCR Buffer	240111-2	250 μL	0.5 mL 本色管
Taq 酶 (5 U/μL)	240350	100 μL	1.5 mL 绿盖管
dNTPs (100 mmol/L)	17-35100-GB-a	100 μL	1.5 mL 本色管
Mg2+ (1 mol/L)	17-35100-GB-b	100 μL	1.5 mL 本色管
伪狂犬病病毒 gH 上游引物干粉（10 μmol/L）	yw17-35100-GB-F-gH	50 次	0.5 mL 白盖管
伪狂犬病病毒 gH 下游引物干粉（10 μmol/L）	yw17-35100-GB-R-gH	50 次	1.5 mL 本色管
伪狂犬病病毒 gH 探针干粉（10 μmol/L）	Pb17-35100-GB-gH	50 次	1.5 mL 本色管
伪狂犬病病毒 gE 上游引物干粉（10 μmol/L）	yw17-35100-GB-F-gE	50 次	1.5 mL 本色管
伪狂犬病病毒 gE 下游引物干粉（10 μmol/L）	yw17-35100-GB-R-gE	50 次	1.5 mL 本色管
伪狂犬病病毒 gE 探针干粉（10 μmol/L）	Pb17-35100-GB-gE	50 次	1.5 mL 本色管
伪狂犬病病毒内参上游引物干粉（10 μmol/L）	yw17-35100-GB-F-IC	50 次	1.5 mL 本色管
伪狂犬病病毒内参下游引物干粉（10 μmol/L）	yw17-35100-GB-R-IC	50 次	1.5 mL 本色管
伪狂犬病病毒内参探针干粉（10 μmol/L）	Pb17-35100-GB-IC	50 次	1.5 mL 本色管
伪狂犬病病毒 PCR 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	Pc35100-GB	50 次	15 mL 本色瓶
内参照质粒	Pc35100-GB-IC	50 次	15 mL 本色瓶
使用手册	17-35100-GB sc	1 份	1 份

<table>
<tr><td></td><td>注意：引物探针用 TE 溶液溶解并稀释至 10 μmol/L 工作液，-20℃保存供检测使用，如经常使用反复冻融，有效期为 3 个月。</td></tr>
<tr><td>运输及保存</td><td>低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。</td></tr>
<tr><td>自备物品</td><td>样品 DNA、DAN-RNA 纯化试剂盒、ddH2O、TE 溶液。</td></tr>
<tr><td>使用方法</td><td>注意事项：本手册根据 2018 年中国国标编写，如有不同之处请以中国国标为准。
一、反应体系的配制
1. 在试剂配制区进行。设实时荧光 PCR 反应管数为 n，n 为待检样品数+阳性管数+阴性管数，为了避免移液器取样损失，建议按 n+1 个反应进行配制。配制反应液在冰盒中进行。
2. 荧光 PCR 反应液配制：在标记管中按下表加入各成分（每个反应体系）
<table>
<tr><th>成分</th><th>1 个检测反应加入量</th></tr>
<tr><td>10× PCR Buffer</td><td>5 μL</td></tr>
<tr><td>Taq 酶 (5 U/μL)</td><td>2 μL</td></tr>
<tr><td>dNTPs (100 mmol/L)</td><td>1.5 μL</td></tr>
<tr><td>Mg2+ (1 mol/L)</td><td>0.25 μL</td></tr>
<tr><td>伪狂犬病病毒 gH 上游
引物干粉（10 μmol/L）</td><td>1 μL</td></tr>
<tr><td>伪狂犬病病毒 gH 下游
引物干粉（10 μmol/L）</td><td>1 μL</td></tr>
<tr><td>伪狂犬病病毒 gH
探针干粉（10 μmol/L）</td><td>1 μL</td></tr>
<tr><td>伪狂犬病病毒 gE 上游
引物干粉（10 μmol/L）</td><td>1 μL</td></tr>
<tr><td>伪狂犬病病毒 gE 下游
引物干粉（10 μmol/L）</td><td>1 μL</td></tr>
<tr><td>伪狂犬病病毒 gE
探针干粉（10 μmol/L）</td><td>0.6 μL</td></tr>
<tr><td>伪狂犬病病毒内参上游
引物干粉（10 μmol/L）</td><td>0.5 μL</td></tr>
<tr><td>伪狂犬病病毒内参下游
引物干粉（10 μmol/L）</td><td>0.5 μL</td></tr>
<tr><td>伪狂犬病病毒内参
探针干粉（10 μmol/L）</td><td>0.5 μL</td></tr>
<tr><td>ddH2O</td><td>23.95 μL</td></tr>
<tr><td>合计</td><td>39.8 μL</td></tr>
</table>
二、反应液的分装</td></tr>
</table>

3. 将上述配制的荧光 PCR 反应液充分混匀，按照每管 39.8 μL 分装于 0.2 mL 透明 PCR 管内，将 PCR 管置于 96 孔板上，按顺序加样并做好标识，转移至核酸提取区。

三、加样

4. 在核酸提取区进行。在每个 PCR 反应管内加入 0.2 μL 的内参照质粒，并分别加入提前制备的核酸 10 μL DNA 溶液，盖上盖子，500 ×g~1000 ×g 离心 30 s。转移至检测区。

5. 盖上盖子后上机，将第 4 步中离心后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内，设置探针：5’选择 FAM、HEX 和 ROX 三个荧光通道，3'均选择无 (None) 荧光。

过程	温度	时间
预反应	50℃	2 min
预变性	95℃	2 min
PCR 反应 （40 个循环）	95℃	15 sec
	60℃	30 sec（采集荧光信号）
冷却	25℃	10 sec

四、结果判定

6. 國值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以國值线刚好超过正常阴性样品扩增的最高点为准。

7. PRV 阴性对照：FAM 通道无报告 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，HEX 通道无报告 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，ROX 通道 Ct 值≤36 且扩增曲线为典型的 S 型。

8. PRV 阳性对照:FAM 通道 Ct 值≤30，HEX 通道 Ct 值≤30，ROX 通道 Ct 值≤36，且 3 个通道的扩增曲线均为典型的 S 型。

9. 以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

10. 被检样本检测结果中 FAM 通道 Ct 值≤38，HEX 通道 Ct 值≤38，且扩增曲线均为典型的 S 曲线，报告为 PRV 核酸阳性；38<Ct 值≤40，判定为可疑，可疑样品须重复检测。如重复后仍然 38<Ct 值≤40，且扩增曲线均为典型的 S 曲线，报告为 PRV 核酸阳性。

11. 被检样本检测结果中 FAM 通道 Ct 值≤40，且扩增曲线为典型的 S 型扩增曲线，HEX 通道无 Ct 值或者无典型的 S 型扩增曲线，报告为 PRV gE 缺失株核酸阳性。

12. 被检样本检测结果中 FAM 通道和 HEX 通道均无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲

	线，同时 ROX 通道 Ct 值≤36 且扩增曲线为典型的 S 曲线，则该样本超过本方法检测灵敏度范围，报告为 PRV 核酸阴性。 13. 被检样本检测结果中 FAM 通道和 HEX 通道均无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，同时 ROX 通道 Ct 值>36，则该样本的检测结果无效，应查找并排除原因，并对此样本进行重复实验。
关联产品	伪狂犬病病毒可视化染料 LAMP 试剂盒

20260908sxl