

猪轮状病毒探针法荧光 RT-LAMP 试剂盒

PRV Probe RT-LAMP Kit

目录号: ml107969

使 用 说 明 书

产品及特点

猪轮状病毒 (Porcine Rotavirus, PRV)是猪群中常见的引起腹泻性疾病的主要病原。 幼龄仔猪易感, 1~4 周龄仔猪发 病率超过 80%, 死亡率达 7% ~ 20%, 症状也较严重。同时, 由于该病常与其他疾病混合感染, 使病情加重, 导致死亡率增高, 给养殖户带来严重的经济损失。因此 PRV 的快速准确鉴定对该病的预防和检疫有着重要作用, 为此, 本公司开发了本检测试剂盒,

它具有下列特点:

1. 即开即用, 用户只需要提供病毒 RNA 样品。
2. 恒温扩增, 可以不需要贵重的荧光 PCR 等贵重仪器。
3. 含探针, 可以进一步提高专一性。
4. 检测灵敏性可以达到 100 拷贝/反应左右。
5. 特异性高, 扩增引物和检测探针均根据猪轮状病毒 RNA 保守序列设计, 不会跟其他生物的 RNA 发

生交叉反应。

6. 一般 30 分钟内出结果，比 RT-PCR 快。

7. 提供无传染性的阳性对照，便于分析实验结果。

8. 提供内参，便于识别假阴性。

9. 本产品只能用于定性分析，不推荐用于定量分析。

10. 上样量大，对 20 μ L 的反应体系，样品加样量高达 13 μ L。

11. 内含的 dUTP-UNG 可防交叉污染。

12. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法荧光 RT-LAMP 扩增。

13. 只可用于科研。

规格及成分

成分	规格	包装
RT-LAMP MasterMix (探针法, 待加酶)	200 μ L	0.5mL 本色盖
逆转录酶-扩增酶混合液	100 μ L	0.5mL 红盖管
20 $\times$ 猪轮状病毒 RT-LAMP 引物探针混合液干粉	50 次	0.5mL 白盖管
猪轮状病毒 RT-LAMP 阳性对照	2.5 $\times$ 10E6 拷贝	0.5mL 黄盖管
猪轮状病毒 RT-LAMP 内参	5 $\times$ 10E6 拷贝	0.5mL 绿盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用五孔盒包装		

注意：首次使用本产品的时候，需要在引物探针混合液干粉管中加入 60 μ L 的自备超纯水，在阳性对照管和内参管中分别加入 250 μ L 和 500 μ L 超纯水，使得阳性对照和内参的浓度均为 1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L。这些溶液用后还有剩余的需放-20 $^{\circ}$ C保存，阳性对照和内参由于是高浓度的模板，容易污染没有模板的 Mix、引物探针混合液和水，因此需要在专门的场地进行稀释。

使用方法

一、样品 RNA 的制备

1. 用自选方法纯化样品 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容，包括本公司的免提取的核酸释放剂。

2. 如果有 N 个样品，则需要做 N+2 个样品制备，包括一个样品制备阳性对照（PC）和一个样品制备阴性对照（NC）。PC 用 10μL 本试剂盒提供的阳性对照（ 1×10^4 拷贝/μL）加一定量的水充当，总体积必须跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样品体积一样，NC 用水替代。

3. N+2 个样品的每个样品在纯化前，每个都要加入本试剂盒提供的 10μL 猪轮状病毒 RT-LAMP 内参（ 1×10^4 拷贝/μL），相当于每个样品在进行核酸纯化前，含有 1×10^5 个拷贝的内参分子。

二、探针法荧光 RT-LAMP 反应（20μL 体系）

4. 注意：第一次使用一个新的试剂盒时，必须先将 100uL 逆转录酶-扩增酶混合液全部加入到 RT-LAMP MasterMix（探针法，待加酶）中，盖上盖子后轻柔颠倒 1 分钟混匀，然后再取用。

5. 反应设置：如果有 N+2 个 RNA 纯化样品，则设置 N+5 个 RT-LAMP 扩增，增加一个阴性对照、一个内参扩增对照和一个阳性对照。在 N+5 个 PCR 管中加入下列成分：

成分	N+2 个样品管	扩增阴性对照	扩增阳性对照	扩增内参对照
RT-LAMP MasterMix（探针法，已加酶）	各 6μL	6μL	6μL	6μL
20×猪轮状病毒 RT-LAMP 引物混合液	各 1μL	1μL	1μL	1μL
N+2 个样品 RNA	各 13μL	-	-	-
超纯水	-	13μL	-	-
猪轮状病毒 RT-LAMP 阳性对照（ 1×10^4 拷贝/μL）	-	-	13μL	-
猪轮状病毒 RT-LAMP 内参（ 1×10^4 拷贝/μL）	-	-	-	13μL

6. 本产品含两种探针，故在设置荧光 PCR 仪时，设置 60 次循环，每次 65℃保温 1 分钟，采集 FAM 和 HEX 两个通道的荧光信号。FAM 是样本探针的荧光标记，HEX 是内参探针的荧光标记，淬灭基团

	均是 TAMRA。 三. 结果分析 7. 判断实验有效性：扩增阴性对照必须没有 FAM 信号的扩增（扩增是指 Ct 在 40 以内，荧光信号呈现标准的 S 型扩增曲线。任何一个不满足此两个条件，均判读为无扩增。下同），扩增阳性对照必须有 FAM 信号的扩增，否则整个实验无效，需要分析原因。扩增阴性对照如果有扩增，表示实验试剂或环境有模板 DNA 的污染。扩增阳性对照没有 FAM 信号的扩增表示试剂盒或扩增设备或操作有问题，需要分别排查。找到原因并解决问题后方可重启实验。 8. 如果实验有效，则可以分析 N+2 个样品的情况。 情况 1、FAM 信号有扩增，则此样品应判为阳性，不论 HEX 信号有无扩增。 情况 2、样 FAM 信号无扩增，但 HEX 信号有扩增，则此样品应判为阴性； 情况 3、FAM 信号和 HEX 信号均无扩增，此样品应判为假阴性（可能原因之一是此样品中有抑制物，也可能核酸在纯化过程中丢失）。此样品需要稀释不同倍数后再测或/和重新进行核酸制备。
自备试剂	待测样品。
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。