

# **BVDV 病毒核酸检测试剂盒**

## **(RT-PCR 荧光探针法)**

### **说明书**

货号：1506731

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点和常见问题！

版本：A/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

## ■ 试剂盒简介

SHENTEK® BVDV 病毒核酸检测试剂盒 (RT-PCR 荧光探针法) 与 SHENTEK® 病毒核酸提取试剂盒 (磁珠法) 配套使用, 用于检测牛病毒性腹泻病毒 (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV)。适用于生物制品中对细胞库, 病毒种子批和牛血清中的 BVDV 病毒污染进行快速检测。

本试剂盒利用荧光探针法 RT-qPCR 技术, 检测灵敏度高, 最低检测限达到 50 copies/反应。检测特异性强, 与牛源病毒 (PI-3、REO-3、BAV-3、BPV), 工程细胞 (CHO、VERO、293T、MDCK、NS0、Sf9), 工程菌 (大肠杆菌、毕赤酵母) 和牛、猪基因组无交叉反应干扰。

## ■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
BVDV Primer&Probe MIX	NNC091	200 $\mu$ L $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
5 $\times$ RT-qPCR Buffer	NNB018	300 $\mu$ L $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
RT-qPCR Enzyme MIX	NNC079	100 $\mu$ L $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
IPC MIX	NNC066	150 $\mu$ L $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
RNase-Free H <sub>2</sub> O	NND008	1.2 mL $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下

## ■ 规格

50 Reactions。

## ■ 有效期

规定储存条件下 24 个月, 具体详见试剂盒标签。

## ■ 适用机型 (包括但不限于以下机型, 使用前需验证检测灵敏度)

- SHENTEK-96S 定量 PCR 系统
- 7500 Real-Time PCR System
- CFX96 定量 PCR 系统
- Roche LightCycler 480 II

## ■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL 或 2.0 mL 无菌 DNase/RNase-free 低吸附离心管

- 96 孔 qPCR 板或八联管
- 1000  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  DNase/RNase-free 低吸附带滤芯枪头
- 病毒核酸提取试剂盒（货号：1506730）
- **BVDV 阳性对照品，联系本公司订购**

## ■ 相关设备

- 生物安全柜
- 迷你离心机
- 漩涡振荡器
- 荧光定量 PCR 仪
- 1000  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  移液枪

## ■ 实验操作流程

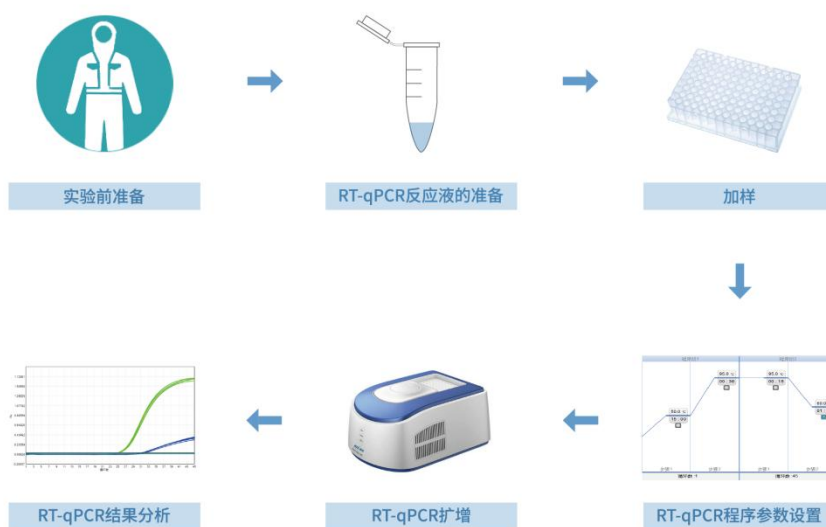


图 1 操作流程示意图

## 一、试剂、仪器准备

### (一) 实验前准备:

1. 穿戴实验服、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
2. 有感染性病毒提取检测和有感染性病毒阳性对照品处理建议在 P2 实验室和生物安全柜中进行。

3. 检测过程中严格使用无核酶的试剂和耗材。
4. 需要使用的试剂提前取出置于冰上融解并充分混匀。

## (二) 病毒核酸提取:

### ● 待测样品的病毒核酸提取

使用**病毒核酸提取试剂盒** (货号: 1506730) 对样品中的病毒核酸提取纯化。对于细胞基质和牛血清样品, 参考病毒核酸提取试剂盒说明书里的细胞基质方法 2 流程进行病毒核酸提取(具体步骤请参考病毒核酸提取试剂盒说明书)。

### ● 阳性对照品 (PCS)

使用 BVDV 阳性对照品作为阳性对照 PCS, 在提取阶段和同批待测样品一起进行相同的样品前处理, 制备成 PCS 纯化液用于 RT-qPCR 检测。

### ● 阴性对照品 (NCS)

使用样品基质溶液 (或 RNase-Free H<sub>2</sub>O) 作为阴性对照 NCS, 在提取阶段和同批待测样品一起进行相同的样品前处理, 制备成 NCS 纯化液用于 RT-qPCR 检测。

## (三) RT-qPCR 反应液准备:

1. 根据所要检测样品数量, 计算所需反应孔数, 一般做 2 个重复孔/样。  

$$\text{反应孔数} = (1 \text{ 个无模板对照 NTC} + 1 \text{ 个阴性质控样品 NCS} + 1 \text{ 个阳性质控样品 PCS} + N \text{ 个待测样品}) \times 2$$
2. MIX 总量计算: 根据反应孔数计算所需的 RT-qPCR MIX 总量。  

$$\text{RT-qPCR MIX} = (\text{反应孔数} + 2) \times 10\mu\text{L} \text{ (含有 2 孔的损失量)}$$
3. 根据表 2 准备各试剂 RT-qPCR MIX 用量。

表 2. RT-qPCR MIX 配制表

组分	单孔用量
BVDV Primer&Probe MIX	3.7 $\mu\text{L}$
5 $\times$ RT-qPCR Buffer	4 $\mu\text{L}$
RT-qPCR Enzyme MIX	1 $\mu\text{L}$
IPC MIX	1.3 $\mu\text{L}$
总体积	10 $\mu\text{L}$

## 二、操作步骤

### (一) 加样

1. 将所有溶液振荡混匀后按表 3 和表 4 所示加样:

表 3.各反应孔加样示例

各样品	加样量
无模板对照 NTC	10 $\mu$ L RT-qPCR MIX + 10 $\mu$ L RNase-Free H <sub>2</sub> O
阴性质控样品 NCS	10 $\mu$ L RT-qPCR MIX + 10 $\mu$ L NCS 纯化液
阳性质控样品 PCS	10 $\mu$ L RT-qPCR MIX + 10 $\mu$ L PCS 纯化液
待测样品	10 $\mu$ L RT-qPCR MIX + 10 $\mu$ L 待测样品提取纯化液

表 4. 96 孔板排版示例

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

- ✧ 该示例表示的是检测 1 个阴性质控样品 NCS、1 个无模板对照 NTC、1 个阳性质控样品 PCS、5 个待测样品。每个检测做 2 个重复孔。
- ✧ 实际检测时可根据样品多少, 参照表 4 示例进行 96 孔板排版加样。

### (二) 程序参数设置

将八联管用配套管盖盖紧或 96 孔板用光学膜封闭, 轻微震荡混匀, 短时间快速离心 10 秒后放入 qPCR 仪, 接着进行 RT-qPCR 程序设置:

- SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例:


1. 点击“实验向导”。
2. “孔板编辑”页面中选择步骤 1: 选择反应孔。

3. 选择步骤 2: 选择项目中的“**BVDV 病毒检测**”程序。
4. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。
- **其他定量 PCR 系统**程序设置如下:
  1. 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
  2. 创建新检测探针, 命名为“BVDV”, 选择报告荧光基团为 FAM, 猝灭荧光基团为 none; 创建 VIC 探针, 选择报告荧光基团为 VIC, 猝灭荧光基团为 none, 检测参比荧光为 ROX (可选)。
  3. 设置 RT- qPCR 反应程序:
    - 50 °C 逆转录 15 分钟;**
    - 95 °C 预变性 30 秒;**
    - 95 °C 15 秒, 60 °C 1 分钟 (读取荧光), 45 个循环;**
    - 反应体积 20  $\mu$ L。

### 三、结果计算与判断

#### (一) 结果计算

- 以 **SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统**、软件版本 8.2.2 为例:
  1. “孔板编辑”页面中步骤 3: 定义反应孔, 将 NTC 孔的样品类型设置为无模板对照, NCS 孔设置为阴性对照, 待测样品孔设置为待测样品。
  2. 在“实验分析”页面点击 , 在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值。
- 以 **7500 Real-Time PCR System**、软件版本 1.4 为例:
  1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, 将 Threshold 设置为 0.02, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。
  2. 在 Results 的 Plate 面板中, 将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将阴性质控 NCS 孔、待测样品孔、PCS 孔的 Task 一栏设置为 Unknown, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S、PCS, 之后点击 .
  3. 在 Results 的 Report 面板中, Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品、PCS 的检测值。

 上述示例结果分析的参数设置仅供参考, 具体需依据实验室机型及使用

的软件版本进行设定，一般也可由仪器自动判读。

## (二) 结果判断

### 1. NTC、NCS、PCS 检测结果参考表 5:

表 5.质控结果分析

质控样品	FAM 信号	VIC 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

\*质控标准应基于实验室验证数据，可从满足检测限要求考虑。

### 2. 待测样品检测结果判定参考表 6:

表 6.待测样品检测结果分析

FAM 信号	VIC 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 $<$ 40 且有效的“S”型扩增	阳性
	2 复孔 Ct $\geq$ 40 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 $<$ 40 且有效的“S”型扩增	阴性
	2 复孔 Ct $\geq$ 40 或扩增曲线无明显起峰	阴阳性无法判断，有抑制

\* VIC 信号如果有抑制，需重测或对样品进行合适处理消除抑制因子。

生效日期：2023 年 05 月 29 日

## 服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

[www.shenkebio.com](http://www.shenkebio.com)

地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: [Info@shenkebio.com](mailto:Info@shenkebio.com)

电话：0572-2165910