



版本号：TRS0315-V2

**牛源病毒（BVDV/REO-3/PI-3/BPV-3/BAV-3）  
核酸检测试剂盒  
（多重 qPCR-荧光探针法）  
说明书**

货 号：

**TRS0315-050(50T)**

**TRS0315-025S (25T)**



## 一、试剂盒简介

牛源病毒（BVDV/REO-3/PI-3/BPV-3/BAV-3）检测试剂盒（多重 qPCR-荧光探针法）是基于荧光探针法的 qPCR 技术，用于快速检测牛血清和细胞中 5 种牛源性病毒污染：牛病毒性腹泻病毒（Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV），呼肠孤病毒 3 型（Reovirus 3, REO-3），牛副流感病毒 3 型（Bovine Parainfluenza 3 Virus, PI-3），牛细小病毒 3 型（Bovine Parvovirus 3, BPV-3）和牛腺病毒 3 型（Bovine Adenovirus type 3, BAV-3）。对需要检测牛源性病毒污染的生物制品（如细胞库、病毒种子批、牛血清等）进行快速检测。本试剂盒特异性强，灵敏度高，最低检测限可达 50~100 copies/反应，与工程细胞（CHO、293T、MDCK、VERO、NS0、Sf9），工程菌（大肠杆菌、毕赤酵母）和牛、猪、犬基因组等无交叉反应干扰。试剂盒内含内参 IC，能够判别待测样本对于扩增反应是否存在抑制，以规避假阴性结果的产生；也可在样品提取时添加内参 IC，从而对提取效果予以监测，

本试剂盒建议与本公司的**病毒核酸提取纯化试剂盒(磁珠法)**试剂搭配使用。

本试剂盒采用了 dUTP/UDG 防污染系统，能够防止假阳性结果的出现，有力保证了结果的准确性。

## 二、储存条件及有效期

1. 在避光-20±5°C条件下储存，有效期 12 个月。
2. 泡沫盒/箱加干冰或冰盒运输，开瓶后避光-20±5°C储存。
3. 产品批号，生产日期见外包装盒。

## 三、试剂盒规格及组分

组分名称	TRS0315-050 (50T)	TRS0315-025S (25T)	保存
2×RT-qPCR reaction buffer	800μL	400μL	-20±5°C
20×Enzyme Mix	80uL	40μL	-20±5°C
2×qPCR Reaction Buffer	800μL	400μL	-20±5°C
BV RNA Primer&Probe MIX	200μL	100μL	-20±5°C，避光
BV DNA Primer&Probe MIX	200μL	100μL	-20±5°C，避光
内部质控（BV IC）	100μL	50μL	-20±5°C
阳性质控（BV PC）	100μL	50μL	-20±5°C
DNA 稀释液	1.5mL×2	1.5mL	-20±5°C

## 四、适用机型（包括但不限于）

ABI 7500 Real-Time PCR System

SLAN-96P/S 全自动医用 PCR 分析系统

## 五、相关设备耗材

一次性无尘手套、1.5ml 无菌低吸附离心管、qPCR 专用无菌无酶八联排管或 96 孔板、1000 $\mu$ L、100 $\mu$ L、10 $\mu$ L 移液器和无菌低吸附带滤芯枪头、荧光定量 PCR 仪、掌式离心机、涡旋混匀仪。

## 六、检测方法

### 实验流程（一） BVDV/REO-3/PI-3 多重 RNA 检测

#### 1. 待测样本的核酸准备

- 1.1 建议配套使用本公司“病毒核酸提取纯化试剂盒(磁珠法)”，提取样本核酸。
- 1.2 将试剂盒放置 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱或冰上融化，涡旋混匀，瞬时离心。

#### 2. qPCR 反应体系的准备

- 2.1 根据所要检测的样本数量，计算所需反应孔数，一般每个样本做 2 个重复孔。

反应孔数=（1 个无模板对照 NTC+1 个提取阳性对照 PCS +1 个提取阴性对照 NCS+N 个待测样品） $\times$ 2

- 2.2 将所需试剂放置冰上融化，根据反应孔数计算所需要反应混合液的总量。

反应混合液总量=（反应孔数+2） $\times$ 20 $\mu$ L（2 为损失孔数）

按以下方案配置反应混合液。

表 1 BVDV/REO-3/PI-3 多重 RNA 反应混合液配置

组分	单孔用量/ $\mu$ L
2 $\times$ RT-qPCR reaction buffer	15
20 $\times$ Enzyme Mix	1.5
BV RNA Pri/Pro Mix	3
内部质控（BV IC）	0.5
总体积	20

\* 若提取时未加入 IC，则按表 1 配置反应混合液；若提取时加入 IC，则在反应混合液中用 DNA 稀释液替代 IC。

### 3. 加样

充分旋涡混匀反应混合液，向每个反应孔加入 20 $\mu$ L 反应混合液及 10 $\mu$ L 待测核酸样品，如表 2 所示。

表 2 加样示例

反应孔	加样示例	反应孔体积
无模板对照 NTC	20 $\mu$ L 反应混合液+10 $\mu$ L DNA 稀释液	30 $\mu$ L
提取阳性对照 PCS	20 $\mu$ L 反应混合液+10 $\mu$ L PCS 纯化液	30 $\mu$ L
提取阴性对照 NCS	20 $\mu$ L 反应混合液+10 $\mu$ L NCS 纯化液	30 $\mu$ L
待测样品	20 $\mu$ L 反应混合液+10 $\mu$ L 待测样品纯化液	30 $\mu$ L

注：①PCS 纯化液可使用 10 $\mu$ L PC+90 $\mu$ L 样品空白 buffer（或者 1 $\times$ PBS）作为样品进行前处理获得，或根据实验室情况调整；

②NCS 纯化液可使用 DNA 稀释液作为样品进行前处理获得。

表 3 96 孔排版示例

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

注：该示例中 NCS 为 1 个阴性质控，NTC 为 1 个无模板对照，PCS 为 1 个阳性对照样品，S1-S3 为 3 个待测样本。每个检测做 2 个重复孔。

### 4. qPCR 程序设置

以 ABI7500 为例：

**4.1** 新建实验，选择“Absolute Quantification”；

**4.2** 输入实验名称，选择 Quantitation-Standard Curve, TaqMan reagents 和 Standard 模式；

**4.3** 选择报告荧光基团，鼠 III 型呼肠孤病毒荧光基团为 FAM，猝灭基团为 None；牛副流感病毒 3 型病毒荧光基团为 HEX，猝灭基团为 None；IC 通道荧光基团为 ROX，猝灭基团为 None；牛腹泻病毒荧光基团为 CY5，猝灭基团为 None；参比荧光选择无；

#### 4.4 设置 qPCR 反应程序:

表 4 RT-qPCR 反应程序

阶段	温度	时间	循环数
逆转录	50°C	10min	1
预变性	95°C	2min	1
循环 1	95°C	15s	40
	60°C	1min	

反应体积选择 30 $\mu$ L，开始运行。

各实验室可根据所用机型进行设置反应程序。

#### 5. 结果分析

以 ABI7500，软件版本 2.4 为例：

##### 5.1. 分析设定

- 推荐阈值（Threshold=0.2），亦可采用自动阈值。如需手动调整，阈值线要高于阴性对照或者基线噪音，通常设置在样本重复性较好的指数增长期的后期，不同通道需要设置各自独立、合适的阈值线。
- 基线通常采用自动基线。如需手动调整，基线起始循环数选择在指数增长期之前，起点需避开起始荧光采集的波动区，终点选择在最早出现指数扩增样本的 Ct 值的前 1~2 个循环。

##### 5.2. 结果判定

- NTC、PCS、NCS 结果判定参考如表 5。

表 5 质控结果分析

质控样品	FAM 信号 (REO-3)	VIC 信号 (PI-3)	CY5 信号 (BVDV)	ROX 信号 (IC)
NTC	Ct $\geq$ 37，或无明显扩增曲线	Ct $\geq$ 37，或无明显扩增曲线	Ct $\geq$ 37，或无明显扩增曲线	Ct < 30，且有明显的扩增曲线
PCS	Ct < 30，且有明显的扩增曲线	Ct < 30，且有明显的扩增曲线	Ct < 30，且有明显的扩增曲线	Ct < 30，且有明显的扩增曲线
NCS	Ct $\geq$ 37，或无明显扩增曲线	Ct $\geq$ 37，或无明显扩增曲线	Ct $\geq$ 37，或无明显扩增曲线	Ct < 30，且有明显的扩增曲线

注：质控结果判定标准，可依据各实验室的检测限验证结果考虑。

待测样品检测结果判断，参考表 6。

表 6 待测样品结果分析

2 复孔 Ct 值				结果判断
FAM 信号 (REO-3)	HEX 信号 (PI-3)	CY5 信号 (BVDV)	ROX 信号 (IC)	
CT<37	/	/	CT<30	REO-3 检出*
/	CT<37	/	CT<30	PI-3 检出*
/	/	CT<37	CT<30	BVDV 检出*
2 复孔 Ct≥37 或 扩增曲线无明显起峰			与 NCS 的 Ct 差值 <2	REO-3/PI-3/BVDV 未检出
			与 NCS 的 Ct 差值 ≥2	有抑制**

注：\*分析各荧光通道的检测值，可能不止一种病毒存在于样品中，只要 2 复孔有 1 孔以上 Ct<37 且有效的 S 型扩增曲线可判断样品中存在该病毒核酸

\*\*若出现有抑制的情况，需重新测试或对样品进行合适处理消除抑制因子。

## 实验流程（二） BPV-3/BAV-3 多重 DNA 检测

### 1. 待测样本的核酸准备

1.3 建议配套使用本公司“病毒核酸提取纯化试剂盒(磁珠法)”，提取样本核酸。

1.4 将试剂盒放置 2~8℃冰箱或冰上融化，涡旋混匀，瞬时离心。

### 2. qPCR 反应体系的准备

2.3 根据所要检测的样本数量，计算所需反应孔数，一般每个样本做 2 个重复孔。

反应孔数=（1 个无模板对照 NTC+1 个提取阳性对照 PCS +1 个提取阴性对照 NCS+N 个待测样品）×2

2.4 将所需试剂放置冰上融化，根据反应孔数计算所需要反应混合液的总量。

$$\text{反应混合液总量} = (\text{反应孔数} + 2) \times 20\mu\text{L} \quad (2 \text{ 为损失孔数})$$

按以下方案配置反应混合液。

表 7 BPV-3/BAV-3 多重 DNA 反应混合液配置

组分	单孔用量/ $\mu\text{L}$
2×qPCR reaction buffer	15
BV DNA Pri/Pro Mix	3
内部质控 (BV IC)	1
水/DNA 稀释液	1
总体积	20

\*若提取时未加入 IC，则按表 1 配置反应混合液；若提取时加入 IC，则在反应混合液中用 DNA 稀释液替代 IC。

### 3. 加样

充分旋涡混匀反应混合液，向每个反应孔加入 20 $\mu\text{L}$  反应混合液及 10 $\mu\text{L}$  待测核酸样品，如表 8 所示。

表 8 加样示例

反应孔	加样示例	反应孔体积
无模板对照 NTC	20 $\mu\text{L}$ 反应混合液+10 $\mu\text{L}$ DNA 稀释液	30 $\mu\text{L}$
提取阳性对照 PCS	20 $\mu\text{L}$ 反应混合液+10 $\mu\text{L}$ PCS 纯化液	30 $\mu\text{L}$
提取阴性对照 NCS	20 $\mu\text{L}$ 反应混合液+10 $\mu\text{L}$ NCS 纯化液	30 $\mu\text{L}$
待测样品	20 $\mu\text{L}$ 反应混合液+10 $\mu\text{L}$ 待测样品纯化液	30 $\mu\text{L}$

注：①PCS 纯化液可使用 10 $\mu\text{L}$  PC+90 $\mu\text{L}$  样品空白 buffer（或者 1×PBS）作为样品进行前处理获得，或根

据实验室情况调整：

②NCS 纯化液可使用 DNA 稀释液作为样品进行前处理获得。

表 9 96 孔排版示例

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

注：该示例中 NCS 为 1 个阴性质控，NTC 为 1 个无模板对照，PCS 为 1 个阳性对照样品，S1~S3 为 3 个待测样本。每个检测做 2 个重复孔。

#### 4. qPCR 程序设置

以 ABI7500 为例：

**4.5 新建实验，选择“Absolute Quantification”；**

**4.6 输入实验名称，选择 Quantitation-Standard Curve, TaqMan reagents 和 Standard 模式；**

**4.7 选择报告荧光基团，牛细小病毒荧光基团为 FAM，猝灭基团为 None；IC 通道荧光基团为 ROX，猝灭基团为 None；牛腺病毒荧光基团为 CY5，猝灭基团为 None；参比荧光选择无；**

**4.8 设置 qPCR 反应程序：**

表 10 qPCR 反应程序

预变性	95°C	10min	1
循环 1	95°C	15s	40
	60°C	1min	

反应体积选择 30μL，开始运行。

各实验室可根据所用机型进行设置反应程序。

#### 5. 结果分析

以 ABI7500, 软件版本 2.4 为例:

### 5.3. 分析设定

- 推荐阈值 (Threshold=0.2), 亦可采用自动阈值。如需手动调整, 阈值线要高于阴性对照或者基线噪音, 通常设置在样本重复性较好的指数增长期的后期, 不同通道需要设置各自独立、合适的阈值线。
- 基线通常采用自动基线。如需手动调整, 基线起始循环数选择在指数增长期之前, 起点需避开起始荧光采集的波动区, 终点选择在最早出现指数扩增样本的 Ct 值的前 1~2 个循环。

### 5.4. 结果判定

- NTC、PCS、NCS 结果判定参考如表 11。

表 11 质控结果分析

质控样品	FAM 信号 (REO-3)	CY5 信号 (BVDV)	ROX 信号 (IC)
NTC	Ct≥37, 或无明显扩增曲线	Ct≥37, 或无明显扩增曲线	Ct<30, 且有明显的扩增曲线
PCS	Ct<30, 且有明显的扩增曲线	Ct<30, 且有明显的扩增曲线	Ct<30, 且有明显的扩增曲线
NCS	Ct≥37, 或无明显扩增曲线	Ct≥37, 或无明显扩增曲线	Ct<30, 且有明显的扩增曲线

注: 质控结果判定标准, 可依据各实验室的检测限验证结果考虑。

- 待测样品检测结果判断, 参考表 12。

表 12 待测样品结果分析

2 复孔 Ct 值			结果判断	
FAM 信号 (BPV-3)	CY5 信号 (BAV-3)	ROX 信号 (IC)		
CT<37	/	CT<30	BPV-3 检出*	
/	CT<37	CT<30	BAV-3 检出*	
2 复孔 Ct≥37 或 扩增曲线无明显起峰			与 NCS 的 Ct 差值<2	BPV-3/ BAV-3 未检出
			与 NCS 的 Ct 差值≥2	有抑制**

注: \*分析各荧光通道的检测值, 可能不止一种病毒存在于样品中, 只要 2 复孔有 1 孔以上 Ct<37 且有效的 S 型扩增曲线可判断样品中存在该病毒核酸

\*\*若出现有抑制的情况, 需重新测试或对样品进行合适处理消除抑制因子。

## 七、注意事项



1. 本试剂盒仅供科研使用，不用于临床诊断。
2. 本试剂盒需严格按照说明书操作步骤使用，以保证最佳的检测结果。
3. 提取阳性对照 PCS，可以加入 10 $\mu$ L PC+90 $\mu$ L 样品空白 buffer（或者 1 $\times$ PBS）作为样本提取，或根据实验室情况调整。
4. IC 通道荧光可以根据实验室情况选择是否收集及后期数据处理。
5. 试剂盒组分建议在低温下融化使用。
6. 建议使用带滤芯吸头。

## 八、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。

