



## Everglades 病毒探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

### 产品及特点:

1. 即开即用, 用户只需要提供样品 RNA 模板。
2. 引物和探针经过优化, 灵敏性高。
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 Everglades 病毒高度保守区设计, 不会跟其他病毒的 RNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的探针法荧光定量 RT-PCR 反应。
6. 本产品只能用于科研。

### 规格及成分:

编号	成分	规格
试剂一	探针法 qRT-PCR 缓冲液	500 $\mu$ L (蓝盖)
试剂二	探针法 qRT-PCR 酶混合液	100 $\mu$ L (红盖)
试剂三	荧光 PCR 专用模板稀释液	1 mL (黄盖)
试剂四	Everglades 病毒探针法 qRT-PCR 引物混合液	100 $\mu$ L (白盖)
试剂五	Everglades 病毒 qRT-PCR 探针	50 $\mu$ L (棕色管)
试剂六	Everglades 病毒探针法 qRT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E8 / $\mu$ L)	50 $\mu$ L (黄盖)
使用手册		1 份

### 运输及保存:

低温运输, -20 $^{\circ}$ C 保存, 保存期限为 12 个月。

### 自备试剂:

样品 RNA。

### 使用方法:

#### 一、稀释标准曲线样品 (以 10E2-10E7 拷贝/ $\mu$ L 这 6 个 10 倍稀释度为例):

由于标准品浓度非常高, 因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行, 千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分)。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原, 本产品不提供活体样品做阳性对照, 只提供无传染性的 DNA 片段作为阳性对照。

1. 标记 6 个离心管, 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。
2. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu$ L 荧光 RT-PCR 专用模板稀释液, 最好用带芯枪头, 下同)。



- 在 7 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照 (试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
- 换枪头, 在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照 (上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
- 换枪头, 在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照 (上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
- 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

## 二、样品 DNA 的制备:

- 如果有 N 个样品, 最好设置 N+2 个提取, 多出的一个是 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  $\mu\text{L}$  阳性对照的 10000 倍稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样, 以此作为 PC。另外用水作为 NC。
- 用自选方法纯化样品的 RNA, 本试剂盒跟市场上大多数病毒 RNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的柱式病毒 RNAout。

## 三、Probe qRT-PCR 反应 (20 $\mu\text{L}$ 体系, 在样品制备室进行) :

- 如果做定量分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+9 个 PCR 管, 其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品, 1 个用于 PCR 阴性对照 (用水做模板), 6 个用于标准曲线。如果做定性分析, 并且只做 1 次重复, 则标记 N+4 个 PCR 管, 其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品, 1 个用于 PCR 阴性对照 (用水做模板), 1 个用于 PCR 阳性对照 (用第 4 号管的阳性对照稀释液做模板)。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
- 在标记管中按下表加入各成分 (本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照, 并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后最后加) :

成份	样品管 N+2 个	RT-PCR 阴 性对照管	标准曲线样品管 (2-7 管)
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	各 10 $\mu\text{L}$
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	各 2 $\mu\text{L}$
Everglades 病毒 qRT-PCR 探针	各 1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	各 1 $\mu\text{L}$
Everglades 病毒探针 qRT-PCR 引物混合液	各 2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	各 2 $\mu\text{L}$
待测样品 RNA 模板	各 5 $\mu\text{L}$	--	--
超纯水	--	5 $\mu\text{L}$	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)	不加	不加	各 5 $\mu\text{L}$ (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管)

- 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 qRT-PCR:



过程	温度	时间
逆转录	50°C	30 min
预变性	94°C	10 min
qRT-PCR 反应 35 个循环	94°C	15 sec
	60°C	1 min, (采集 FAM 通道的荧光信号)

#### 四、数据处理：

12. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的  $\log$  值为横轴，以  $C_t$  值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的  $C_t$  值从标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的  $\log$  值，再推算出其浓度。

13. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照  $C_t$  必须大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线， $C_t$  值应该小于或等于 30。对待测样品，如果其  $C_t$  大于或等于 40 则为阴性，如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。重复实验的  $C_t$  值如果大于或等于 40 则为阴性，如果小于 40，则为阳性。

**上海纪宁实业有限公司([www.shjning.com](http://www.shjning.com))所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。**