



## Sammarez Reef 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 Sammarez Reef 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 | Sammarez Reef 病毒探针法 qRT-PCR 引物混合液                              | 100 $\mu$ L (白盖) |
| 试剂五 | Sammarez Reef 病毒 qRT-PCR 探针                                    | 50 $\mu$ L (棕色管) |
| 试剂六 | Sammarez Reef 病毒探针法 qRT-PCR 阳性对照<br>(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)。
3. 在 7 号管中加入 5  $\mu$ L  $1 \times 10E8$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E7$  拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 6 号管中加入 5  $\mu$ L  $1 \times 10E7$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 5 号管中加入 5  $\mu$ L  $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E5$  拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 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：

7. 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 $\mu$ 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。
8. 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 $\mu$ L 体系，在样品制备室进行)：



9. 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。

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

11. 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 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 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 Ct 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，Ct 值应该小于或等于 30。对待测样品，如果其 Ct 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 Ct 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。**