



## 马传染性贫血病毒探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

### 产品及特点:

马传染性贫血病简称马传贫(EIA),由反录病毒科慢病毒亚科中的马传染性贫血病病毒(Equine Infectious Anemia Virus)引起的马、骡、驴传染病。其特征主要为间歇性发烧、消瘦、进行性衰弱、贫血、出血和浮肿等,因此快速灵敏诊断具有重要意义。本产品就是以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测马传染性贫血病毒的试剂盒,

### 它具有下列特点:

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,引物是根据马传染性贫血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 | 马传染性贫血病毒探针法 qRT-PCR 引物混合液 | 100 $\mu$ L (白盖) |
| 试剂五 | 马传染性贫血病毒 qRT-PCR 探针       | 50 $\mu$ L (棕色管) |



|      |  |                 |
|------|--|-----------------|
| 试剂六  | 马传染性贫血病毒探针法 qRT-PCR 阳性对照<br>( $1 \times 10^8$ / $\mu$ L) | 50 $\mu$ L (黄盖) |
| 使用手册 |  | 1 份             |

## 运输及保存:

低温运输,  $-20^{\circ}\text{C}$ 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 $10^2$ - $10^7$ 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  $1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^6$  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  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^5$  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                          |
| 马传染性贫血病毒 qRT-PCR 探针      | 各 1 $\mu$ L  | 1 $\mu$ L        | 各 1 $\mu$ L                          |
| 马传染性贫血病毒探针 qRT-PCR 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, 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。**

