



东部马脑脊髓炎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, 引物是根据东部马脑脊髓炎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 μ 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 μ L (蓝盖) |
| 试剂二 | 探针法 qRT-PCR 酶混合液 | 100 μ L (红盖) |
| 试剂三 | 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 1 mL (黄盖) |
| 试剂四 | 东部马脑脊髓炎病毒探针法 qRT-PCR 引物混合液 | 100 μ L (白盖) |
| 试剂五 | 东部马脑脊髓炎病毒 qRT-PCR 探针 | 50 μ L (棕色管) |
| 试剂六 | 东部马脑脊髓炎病毒探针法 qRT-PCR 阳性对照 (1×10^8 / μ L) | 50 μ L (黄盖) |
| | 使用手册 | 1 份 |

运输及保存:

低温运输, -20°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/ μ 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 μ 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 μ L $1 \times 10E8$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E7$ 拷贝/ μ 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 μ L $1 \times 10E7$ 拷贝/ μ 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/ μ 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 μ L $1 \times 10E6$ 拷贝/ μ 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/ μ 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 μ 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 μ 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 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 μ L | 10 μ L | 各 10 μ L |
| 探针法 qRT-PCR 酶混合液 | 各 2 μ L | 2 μ L | 各 2 μ L |
| 东部马脑脊髓炎病毒 qRT-PCR 探针 | 各 1 μ L | 1 μ L | 各 1 μ L |
| 东部马脑脊髓炎病毒探针 qRT-PCR 引物混合液 | 各 2 μ L | 2 μ L | 各 2 μ L |
| 待测样品 RNA 模板 | 各 5 μ L | -- | -- |
| 超纯水 | -- | 5 μ L | -- |
| 第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号) | 不加 | 不加 | 各 5 μ 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)所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。