



河蟹颤抖病病毒染料法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

产品及特点：

河蟹颤抖病病毒(Chinese Mitten Crabs Trembling Disease Virus)是一种 RNA 病毒，会引起河蟹颤抖病，是当前危害河蟹最严重的一种疾病，我国将其列为三类动物疫病，病蟹反应迟钝、行动迟缓，螯足的握力减弱，吃食减少以致不吃食；鳃排列不整齐、呈浅棕色、少数甚至呈黑色，血淋巴液稀薄、凝固缓慢或不凝固；最典型的症状为步足颤抖、环爪、爪尖着地、腹部离开地面，甚至蟹体倒立。河蟹是该病唯一的敏感种类，从体重 3g 的蟹种至 300g 以上的成蟹均可患病。3~11 月为主要发病季节，严重发病地区发病率高达 90%以上，死亡率在 70%以上，对河蟹养殖业危害巨大，因此灵敏快捷的诊断产品具有重要的意义。本产品基于 PCR 原理开发。

1. 一站式，用于不需要单独准备每种成分，包括引物和对照。
2. 根据河蟹颤抖病病毒的保守基因序列设计的引物，具有良好的特异性。
3. 基于染料法 qRT-PCR 检测，灵敏度比常规 RT-PCR 高 10-100 倍，可以达到至少 1000 拷贝/反应。
4. 使用一管式 qRT-PCR 技术，RT 和 PCR 两步在一个试管内完成，不需要中间转移样品，降低了操作误差和可能的污染。
5. 本产品足够 50 次 30 μ L 体系的 RT-PCR。

规格及成分：

编号	成分	规格
试剂一	2 \times qRT-PCR 缓冲液	500 μ L (棕色管)
试剂二	10 \times qRT-PCR 酶混合液	100 μ L (红盖)
试剂三	ROX 染料 I, 50 \times	20 μ L (棕色管)
试剂四	ROX 染料 II, 50 \times	20 μ L (棕色管)
试剂五	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL (黄盖)



试剂六	河蟹颤抖病病毒染料法 qRT-PCR 引物混合液	100 μ L (白盖)
试剂七	河蟹颤抖病病毒染料法 qRT-PCR 阳性对照 (1 \times 10E8 拷贝/ μ L)	50 μ L (黄盖)
试剂八	沙核酸释放剂 (试用装)	20 次 (1mL, 绿盖)
试剂九	使用手册	1 份

运输及保存:

低温运输、-20 $^{\circ}$ C保存, 有效期一年。

阳性对照需要因易污染其他成分需要单独放置。本产品不提供活体样品做阳性对照, 只提供 DNA 片段作为阳性对照。

自备试剂:

样品 RNA。

使用方法:

一、稀释阳性对照:

以 10E2-10E7 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。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原。

1. 标记 6 个离心管, 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。用带芯枪头分别加入 45 μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液, 最好用带芯枪头, 下同)。
2. 在 7 号管中加入 5 μ L 1 \times 10E8 拷贝/ μ L 的阳性对照(本试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1 \times 10E7 拷贝/ μ L 的阳性对照。放冰上待用。
3. 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 的阳性对照。放冰上待用。
4. 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 的阳性对照。放冰上待用。重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备:



5. 如果有 N 个样品，必须设置 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 上步制备的阳性对照梯度稀释液中的第 4 号（浓度为 1 \times 10E4 拷贝/ μ L，10 μ L 相当于 1 万拷贝）再加上一定量的水作为制备的阳性对照（加水后其总体积跟样品一样，样品体积多少取决于所用试剂盒的要求）。可以用水作为制备的阴性对照。

6. 用自选方法纯化 N+2 个样品的 RNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒 RNA 提取试剂盒兼容。

三、设置 RT-PCR 反应 (20 μ L 体系，在样品制备室进行)：

7. 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，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 号阳性对照稀释液做模板）。下面只描述定量分析的步骤，定性分析只是把 6 个标曲反应缩减成 1 个，其余不变。

8. 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，阳性对照样品要等所有管子盖上盖子后最后加）：

成分	N+2 个制备所得样品	qRT-PCR 阴性对照	qRT-PCR 阳性对照 (2-7 管)
2 \times qRT-PCR 缓冲液	10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
河蟹颤抖病病毒染料法 qRT-PCR 引物混合物	2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
50 \times ROX (见注)	0.4 μ L	0.4 μ L	各 0.4 μ L
样品制备所得 RNA 模板 (来于第 8 步)	5.6 μ L	--	--
稀释所得 6 个阳性对照 (来于第 6 步)	--	--	各 5.6 μ L (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管...)
超纯水	--	5.6 μ L	--



10×qRT-PCR 酶混合液	2μL	2μL	2μL
-----------------	-----	-----	-----

注： 需使用 ROX 染料 I 的机型：ABI Prism7000、7300、7700、7900HT、

Step-One、Step-One Plus。

需使用 ROX 染料 II 的机型：：ABI Prism 7500、7500Fast、MJ Research 的

Chromo4、Opticon (II) Corbett Rotor Gene 3000。

不需要使用 ROX 的机型：Thermal Cycle Dice Real Time System, LightCycler、Smart

Cycler System、Agilent Mx3000P、RotorGene3000、RotorGene 6000。

9. 上机后按下面参数进行 RT-PCR (参数可能会因仪器不同而需优化)。

过程	温度	时间
RT (逆转录)	50°C	15-30 min
预变性	95°C	5 min
Qrt-PCR 反应 40 个循环	95°C	15 sec
	58°C	1 min, (采集 FAM 通道的荧光信号)
按仪器预设程序进行溶解曲线分析		

四、数据处理：

10. 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 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。

11. 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。

