

Everglades 病毒探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

咨询 QQ : [2881498726](https://www.qq.com)

订购热线 : [021 - 54720761](tel:021-54720761)

咨询电话 : [13166274233\(微信同号\)](https://www.weixin.com)

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 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	Everglades 病毒探针法 qRT-PCR 引物混合液	100 μ L (白盖)
试剂五	Everglades 病毒 qRT-PCR 探针	50 μ L (棕色管)
试剂六	Everglades 病毒探针法 qRT-PCR 阳性对照 (1 \times 10E8 / μ L)	50 μ 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/ μL 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 μL 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 μL $1 \times 10E8$ 拷贝/ μL 的阳性对照（试剂盒提供），充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E7$ 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 6 号管中加入 5 μL $1 \times 10E7$ 拷贝/ μL 的阳性对照（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E6$ 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL $1 \times 10E6$ 拷贝/ μL 的阳性对照（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E5$ 拷贝/ μL 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 RNA 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 μL 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 μL 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 μL	10 μL	各 10 μL
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 μL	2 μL	各 2 μL
Everglades 病毒 qRT-PCR 探针	各 1 μL	1 μL	各 1 μL
Everglades 病毒探针 qRT-PCR 引物混合液	各 2 μL	2 μL	各 2 μL

待测样品 RNA 模板	各 5 μL	--	--
超纯水	--	5 μL	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)	不加	不加	各 5 μL (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 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。

所有产品仅供科研使用, 不得用于其他用途。

