天净沙系列

CAT#:17-54200

低温运输，-20℃保存

天净沙

草鱼呼肠孤病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒（含内参）

Grass Carp Reovirus Probe qRT-PCR Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

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 GCRV 的含内参试剂盒，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，分析灵敏度高，可以达到 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于制备标准曲线和用作扩增对照，排除假阴性结果。
4. 含识别内源性内参的引物和探针，便于排除 RT-PCR 假阴性结果。
5. 特异性高，靶分子的引物和探针是根据 GCRV RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。
7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 RT-PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
探针法 qRT-PCR 缓冲液	990504a	500 μL	0.5 mL 蓝盖管
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	990504bv2	50 μL	0.5 mL 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
GCRV qRT-PCR 引物-探针干粉（含内参引物探针）	yp17-54200	50 次	0.5 mL 棕色管
GCRV qRT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	pc54200	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	17-54200sc	1 份	无

注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 220 μL 的超纯水充分混匀后的得到引物-探针混合液再使用，未用完的需要-20℃保存。

运输及保存

低温运输，-20℃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（以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例）。

1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。
2. 在各管中加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液。
3. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。

5. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线阳性样品。放冰上待用。

二、样品 RNA 的制备

6. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是制备 PC（样品制备阳性对照），一个是制备 NC（样品制备阴性对照）。可以用确认是阳性的样本作为阳性对照，用确认是阴性的样本作为阴性对照。

7. 用自选方法纯化样品的 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容，也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qRT-PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

8. 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 RT-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 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 RT-PCR 阳性对照（直接用第 5 步第 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。

9. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复）：

成分	样品管 N+2 个	RT-PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 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 v2	各 1 μL	1 μL	各 1 μL
GCRV qRT-PCR 引物-探针混合液(含内参引物和探针)	各 4 μL	4 μL	4 μL
N+2 个待测样（含内源性内参）	各 5 μL	不加	不加
超纯水	不加	5 μL	不加
第 5 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 5 μL（2 号样到 2 号管，3 号样到 3 号管…）

10. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 RT-PCR：

过程	温度	时间
逆转录	50℃	10 min
预变性	95℃	4 min
RT-PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec
	60℃	45 sec（采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 BHQ）

注：部分（如：伯乐 CFX96）机型如果两步法效果不理想可采用三步法：50℃ 10

	分钟，94℃ 2 分钟（94℃ 15 秒、52℃ 15 秒、72℃ 30 秒）循环 35-45 次，每个循环第三步采集荧光信号。 **四、数据处理** 11. 阴性阳性判断：没有 Ct 读数，或 Ct 大于 40 判为阴性结果。有 Ct 读数，Ct 值小于 40，荧光信号有对数增长，有典型扩增曲线判为阳性结果。每个样本需要对 FAM 通道和 Cy5 通道的结果分别进行判定，得到两个结果。 12. 实验有效性判断：如果扩增阳性对照或制备阳性对照 FAM 通道结果为阴性则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析原因，可能是操作、仪器和试剂三方面的原因，重做扩增或制备或跟仪器和试剂厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照 FAM 通道结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析失败原因，直到污染消除。如果阳性对照和阴性对照正常，则进入下一步分析样本的有效性。 13. 样本有效性判断：如果样本 FAM 通道的结果为阳性，则无论内参通道的结果是阴性还是阳性，样本的结果均有效。如果样本结果为阴性，内参通道结果也为阴性，则此样品的阴性结果无效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。 14. 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，分别以阳性对照 FAM 通道和内参通道的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线为斜线，r2 必须大于 0.95，内参通道读数的标准曲线为一条跟 X 轴平行的横线。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。 15. 如果用于定性实验，对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 没有读数、或 Ct 大于或等于 40 则均为阴性，如果小于 40 则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的待测样本，如果其对应的内参通道也为阴性，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。
关联产品	草鱼呼肠孤病毒可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒