天净沙系列

CAT#:14-83800

低温运输，-20℃保存

赤羽病病毒染料法 qRT-PCR 试剂盒

Akabane Disease Virus SYBR 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

本公司以染料法 qRT-PCR 技术为基础开发了赤羽病病毒（AKAV）的检测试剂盒，它具有下列特点：

1. 一站式，用户不需要单独准备每种成分，只需要提供 RNA 样品。
2. 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 100 拷贝/反应。
3. 根据赤羽病病毒的保守序列设计引物，具有良好的特异性，不会跟其它生物的 RNA 发生交叉反应。
4. 使用一管式 qRT-PCR 技术，RT 和 PCR 两步在一管内完成，不需要中间转移样品，降低了操作误差和可能的污染。
5. 本产品可用于定性检测，也可用于定量检测。定量检测时线性范围至少有 5 个数量级。
6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的 qRT-PCR 反应。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×SYBR qRT-PCR 缓冲液	990102a	500 μL	0.5 mL 本色管
SYBR qRT-PCR 酶混合液 v2	990102bv2	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
AKAV qRT-PCR 引物干粉	yw15-83800ys-v1.1	50 次	0.5 mL 白盖管
AKAV qRT-PCR 阳性对照（1E7 拷贝/μL）	pc83800-MH734959	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	14-83800sc	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 110 μL 的超纯水充分混匀后再使用，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。阳性对照需要单独放置。

自备试剂

样品 RNA

使用方法

一、稀释阳性对照（以 1E1-1E6 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）。

1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头（下同）。
2. 换枪头，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 的阳性对照。放冰上待用。

3. 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 的阳性对照。放冰上待用。

4. 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 RNA 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 μL 上步制备的阳性对照梯度稀释液中的第 4 号（浓度为 1E4 拷贝/μL，10 μL 相当于 1 万拷贝）再加上一定量的水作为制备的阳性对照，加水后其总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样品体积一样。可以用水作为核酸制备的阴性对照 NC。

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样品 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、设置 RT-PCR 反应（20 μL 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（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 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。

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	RT-PCR 阴性对照	RT-PCR 阳性对照（1-6 管）
2×SYBR qRT-PCR 缓冲液	10 μL	10 μL	各 10 μL
AKAV qRT-PCR 引物混合物	2 μL	2 μL	各 2 μL
N+2 个 RNA 模板	7 μL	不加	不加
自备超纯水	不加	7 μL	不加
6 个阳性对照稀释液	不加	不加	各 7 μL（2 号样到 2 号管，3 号样到 3 号管…）
SYBR qRT-PCR 酶混合液 v2	1 μL	1 μL	1 μL

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℃	10 min.

预变性	95℃	5 min.
RT-PCR 反应 （35 个循环）	95℃	15 sec.
	65.2℃	30 sec.
	72℃	30 sec.（采集 SYBR 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. 通过溶解曲线分析排除无效数据。有 Ct 值，但 Tm 值跟阳性对照 Tm 不一样的样品结果，归为假阳性，此样本 Ct 数据无效，不予以分析。Tm 跟阳性对照 Tm 一致的，为有效 Ct。
11. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 PCR 阴性对照）的溶解曲线所得 Tm 值跟阳性对照的 Tm 值一样，说明环境或试剂可能有过去的 PCR 扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。如果两种阳性对照（样品制备阳性对照和 PCR 阳性对照）无 Ct 值则无效。
12. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 qRT-PCR 阴性对照）是假阳性，有 Ct 但 Tm 与阳性样本不同，实验有效可以继续分析其它样品有效数据。
13. 对定量检测，以阳性对照样品的浓度的 log 值为横轴，以有效 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效 Ct 值从标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的 log 值，再换算出待测样品的 RNA 浓度。
14. 对定性检测，则有有效 Ct 值的为阳性，无有效 Ct 值的为阴性。

关联产品	赤羽病病毒可视化染料-荧光染料 RT-LAMP 试剂盒