天净沙系列

CAT#:16-54200

低温运输，-20℃保存

天净沙

草鱼呼肠孤病毒可视化染料-荧光染料 RNA 恒温扩增试剂盒

Grass Carp Reovirus Colorimetric and Fluorescent RNA Isothermal Amplification Kit

使用手册 V0.53

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

本公司根据独有的双染料 RNA 恒温扩增技术，开发了简单快捷的草鱼呼肠孤病毒 RNA 恒温扩增检测试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供病毒 RNA 样品。
2. 恒温扩增，可以不需要荧光 PCR 等贵重仪器。
3. 含可见光和荧光染料，既可以用肉眼判断结果，也可用荧光 PCR 仪进行实时荧光检测。
4. 检测灵敏性一般比 RT-PCR 高 10 倍以上，分析灵敏度可以达到 100 拷贝/反应左右。
5. 特异性高，根据草鱼呼肠孤病毒 RNA 保守序列设计 4 条特异引物，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
6. 一般 30 分钟内出结果，比 RT-PCR 快。
7. 提供无传染性的阳性对照，便于分析实验结果。
8. 本产品只能用于定性分析，不推荐用于定量分析。
9. 上样量大，对 20 μL 的反应体系，最大样品加样量高达到 13 μL。
10. 内含的 dUTP-UNG 可防交叉污染。
11. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的染料法荧光及可视化 RNA 恒温扩增扩增。
12. 只可用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装
RNA 恒温扩增 MasterMix （可视化染料-荧光染料双染料法，待加酶）	211224a	200 μL	0.5 mL 本色管
逆转录酶-扩增酶混合液	211208b	100 μL	0.5 mL 红盖管
20×草鱼呼肠孤病毒 RNA 恒温扩增引物冻干粉	yw16-54200	50 T	0.5 mL 白盖管
草鱼呼肠孤病毒 RNA 恒温扩增阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc54200	250 μL	0.5 mL 黄盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	16-54200sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。

自备试剂

待测样品。

使用方法

一、样品 RNA 的制备

1. 用自选方法纯化样品 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容，包括本公司的免提取的核酸释放剂。
2. 如果有 N 个样品，则需要做 N + 2 个样品制备，包括一个样品制备阳性对照（PC）和一个样品制备阴性对照（NC）。PC 用 10 μL 本试剂盒提供的阳性对照（1E4 拷贝/μ

L）加一定量的水充当，总体积必须核酸纯化试剂盒所要求的起始样品体积一样，NC用水替代。

二、RNA 恒温扩增反应（20 μL 体系）

3. 注意：首次使用本试剂盒时，先短暂离心装引物冻干粉的离心管，然后加入 55 μL 超纯水充分混匀，得到 20×草鱼呼肠孤病毒 RNA 恒温扩增引物混合液，放冰上待用。未用完的需要-20℃保存。

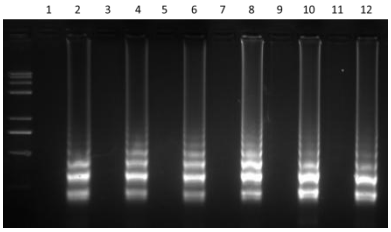
4. 第一次使用一个新的试剂盒时，必须先将 100 μL 逆转录酶-扩增酶混合液全部加入到 RNA 恒温扩增 MasterMix（可视化染料-荧光染料双染料法，待加酶）中，盖上盖子后轻柔颠倒 1 分钟混匀，然后再取用。如果有 N + 2 个 RNA 纯化样品，则最好设置 N + 4 个 RNA 恒温扩增扩增，增加 RNA 恒温扩增阴性对照和 RNA 恒温扩增阳性对照各 1 个。在 N + 4 个 PCR 管中加入下列成分：

成分	N + 2 个样品管	RNA 恒温扩增阴性对照	RNA 恒温扩增阳性对照
RNA 恒温扩增 MasterMix（可视化染料-荧光染料，已加酶）	各 6 μL	6 μL	6 μL
20×草鱼呼肠孤病毒 RNA 恒温扩增引物混合液	各 1 μL	1 μL	1 μL
N + 2 个样品 RNA	各 13 μL	-	-
超纯水	-	13 μL	-
草鱼呼肠孤病毒 RNA 恒温扩增阳性对照(1E4 拷贝/μL)	-	-	13 μL

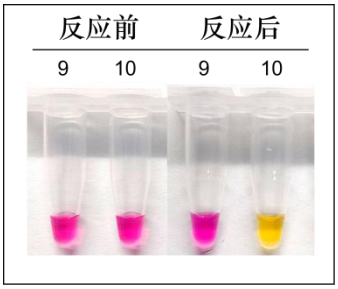
5. 放荧光定量 PCR 仪中进行扩增。循环参数是 60 次循环，每个循环为 65℃保温 1 分钟，采集 SYBR 通道的荧光信号。不推荐使用金属浴或水浴，因为其温度波动大，导致假阳性率很高。

三、结果分析

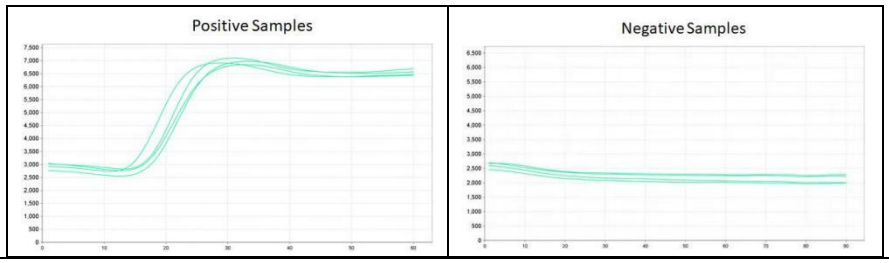
6. 电泳分析：由于取样时非常容易产生气溶胶污染，污染实验环境并且非常难清除污染，所以强烈建议不要采取此方法分析实验结果。即使使用，也要在不同的房间，使用不同的移液枪操作。具体做法是取 10 μL RNA 恒温扩增扩增产物跟自备上样液混合后进行 2%琼脂糖凝胶电泳。RNA 恒温扩增阳性对照必须有正常 RNA 恒温扩增条带（200 bp 左右的梯形扩增产物），RNA 恒温扩增阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果 RNA 恒温扩增阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下表，奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果：



7. 可将光（肉眼）分析：样品制备阳性对照和 RNA 恒温扩增阳性对照的反应液将呈黄色，样品制备阴性对照和 RNA 恒温扩增阴性对照的反应液将呈红色，否则提取实验或扩增实验无效。如果阳性和阴性对照结果正常，则实验有效，可以分析样品的情况。样品管的颜色接近扩增阳性对照管则说明样品为阳性，如果接近阴性对照则说明待测样品为阴性。典型的可将光检测结果见下图（9 为阴性，10 为阳性）。



8. 荧光分析（仅限于用 qPCR 仪进行反应的场景）：样品制备阳性对照和 RNA 恒温扩增阳性对照的反应液将有标准的 S 扩增曲线，样品制备阴性对照和 RNA 恒温扩增阴性对照的反应液将没呈平线，没有 S 曲线，否则提取实验或扩增实验无效。如果阳性和阴性对照结果正常，则实验有效，可以分析样品的情况。样品管的荧光曲线为 S 型，则说明样品为阳性，如果为平线则说明待测样品为阴性。典型的荧光检测结果见下图。左边为阳性，右边为阴性。



关联产品	草鱼呼肠孤病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒（不含内参）