**水泡性口炎病毒印第安纳型探针法荧光定量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   
订购热线 ： 021－54720761**

**咨询电话 ： 13166274233(微信同号)**

**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，引物是根据水泡性口炎病毒印第安纳型高度保守区设计，不会跟其他病毒的RNA发生交叉反应。

5. 本产品足够 50 次 20μL 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 μL（蓝盖） |
| **试剂二** | 探针法 qRT-PCR 酶混合液 | 100 μL（红盖） |
| **试剂三** | 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 1 mL（黄盖） |
| **试剂四** | 水泡性口炎病毒印第安纳型探针法qRT-PCR引物混合液 | 100 μL（白盖） |
| **试剂五** | 水泡性口炎病毒印第安纳型 qRT-PCR 探针 | 50 μL（棕色管） |
| **试剂六** | 水泡性口炎病毒印第安纳型探针法qRT-PCR阳性对照  (1×10E8/μL) | 50 μL（黄盖） |
| **使用手册** | | **1 份** |

**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 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 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E7 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 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 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 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 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 10μL 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（20μL 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 |
| 水泡性口炎病毒印第安纳型 qRT-PCR 探针 | 各 1 μL | 1 μL | 各 1 μL |
| 水泡性口炎病毒印第安纳型探针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℃ | 30 min |
| **预变性** | 94℃ | 10 min |
| qRT-PCR反应35个循环 | 94℃ | 15 sec |
| 60℃ | 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 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 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。

**所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。**