



# 芹菜花叶病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒

Celery Mosaic Virus Probe qRT-PCR Kit

仅

供

科

研

使

用

产品及特点

芹菜花叶病毒(Celery Mosaic Virus, CeMV)属于马铃薯病毒科马铃薯 Y 病毒属, 病毒粒体为线状, 长度为 760 ~ 780 nm。芹菜花叶病毒的传染性和存活率比较高, 在自然界中主要通过汁液接触及蚜虫传播, 还可从寄主伤口侵入进行传播。不同寄主被侵染后表现出不同的症状, 苗期受侵染时, 菜心生长停滞、扭曲、全株矮小甚至枯死, 被侵染芹菜产量和品质会受到明显影响。芹菜花叶病毒会严重减低芹菜产量, 甚至使之丧失商品价值, 因此快速检测芹菜花叶病毒具有重要的意义。为此, 本公司以探针法 qRT-PCR 技术为基础开发了芹菜花叶病毒的检测试剂盒, **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, 便于区分假阴性样品。
- 4. 特异性高, 引物是根据芹菜花叶病毒 RNA 高度保守区设计, 不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
- 5. 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。
- 6. 本产品足够 50 次 20  $\mu$ L 体系的探针法 qRT-PCR 反应。
- 7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

| 成分   | 包装               |
|--|------------------|
| 2 $\times$ Probe qPCR MasterMix  | 500 $\mu$ L(本色盖) |
| 荧光 PCR 专用模板稀释液   | 1mL(绿色盖)         |
| 流脑 A,B,Y 群探针法 qPCR 引物-探针混合液  | 150 $\mu$ L(棕色管) |
| 流脑 A,B,Y 群探针法 qPCR 阳性对照(1 $\times$ 10E7 拷贝/ $\mu$ L)   | 50 $\mu$ L(黄色盖)  |
| 使用手册   | 1 份              |
| 本产品采用五孔盒包装   |                  |
| <b>注 意:</b> 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 165 $\mu$ L 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20 $^{\circ}$ C保存。 |                  |

使用方法

**一、稀释 PCR 阳性对照** (以 1E1-1E6 拷贝/ $\mu$ L 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以 10E1-10E6 拷贝/ $\mu$ L 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。本阳性对照由流感 A、B 和 Y 群专一性的三种 DNA 片段组成。

1. 标记 6 个离心管，分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。
2. 用带芯枪头分别加入 45μL 荧光 PCR 专用模板稀释液（用带芯枪头，下同）。
3. 在 6 号管中加入 5μL  $1 \times 10^7$  拷贝/μL 的阳性对照（试剂盒提供），充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^6$  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 5μL  $1 \times 10^6$  拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^5$  拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。换枪头，在 5 号管中加入 5μL  $1 \times 10^6$  拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^5$  拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5μL  $1 \times 10^5$  拷贝/μL 的阳性对照 (上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^4$  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。放冰上用。

## 二、样品 DNA 的制备

7. 如果有 N 个样品，必须设置 N+2 个提取，多出的一个是样品制备 PC（样品制备阳性对照），一个是样品制备 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，以此作为样品制备 PC。另外用水作为样品制备 NC。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容。

## 三、Probe qPCR 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 号管中的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为描述操作步骤，

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加）：

| 成分                          | 样品管<br>N+2 个 | PCR<br>阴性对照 | 标准曲线样品管<br>(1-6 管) |
|-----------------------------|--------------|-------------|--------------------|
| 2×Probe qPCR MasterMix      | 各 10μL       | 10μL        | 各 10μL             |
| 流脑 A,B,Y 群探针法 qPCR 引物-探针混合液 | 各 4μL        | 4μL         | 各 4μL              |
| N+2 个待测 DNA 样本              | 各 6μL        | 不加          | 不加                 |
| 超纯水                         | 不加           | 6μL         | 不加                 |
| 第 6 步所得标准曲线样品稀释液（1-6 号）     | 不加           | 不加          | 各 6μL              |

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：

| 过程                  | 温度  | 时间   |
|---------------------|-----|--|
| 预热                  | 50℃ | 2min   |
| 预变性                 | 95℃ | 10min  |
| qPCR 反应（45 个<br>循环） | 95℃ | 15sec  |
|                     | 60℃ | 1min（采集 FAM 通道的荧光信号）<br>（采集 HEX 通道的荧光信号）<br>（采集 ROX 通道的荧光信号） |

说明：FAM 为 A 群专一性扩增，HEX 为 B 群专一性扩增，ROX 为 Y 群专一性扩增。

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 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。一次实验可以得到三种靶分子的标准曲线，FAM 通道得到的数据是 A 群的，HEX 通道得到的数据是 B 的，ROX 通道得到的数据是 Y 群。

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 45。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 40。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 45 则为阴性，如果小于或等于 40 则为阳性。如果在 40-45 之间，则重复一次。若重复结果 Ct 值小于 45，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。一次实验可以得到三种靶分子的 Ct，FAM 通道得到的数据是 A 群的，HEX 通道得到的数据是 B 的，ROX 通道得到的数据是 Y 群。 |
| PCR 编号 | TW-E11069  |
| 说明书    | 1 份  |
| 自备试剂   | 样品 DNA。  |
| 运输及保存  | 低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。   |

**生产企业：上海通蔚实业有限公司**

**公司地址：上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603**

**公司电话：021-54845833**

**技术支持：15800441009**