

天
净
沙
系
列

CAT#:13-4640
低温运输, -20°C保存

BINGENE

番茄斑萎病毒 RT-PCR 检测试剂盒

Tomato spotted wilt Tirus (TSWV) RT-PCR Kit

使用手册 V1.0

北京克必隆分子诊断技术有限公司

网址 : www.bingene.com ; 电话 : 400-6005850 ; 电邮 : order@bingene.com

产品及特点	番茄斑萎病毒(Tomato spotted wilt Tirus Viruses , TSWV)番茄斑萎病毒是一种 RNA 病毒，因首先在染病番茄上发现而命名，番茄斑萎病毒的分布范围很广，可侵害 160 种双子叶植物与 10 种单子叶植物，因感染该病毒而发生的作物疾病称为斑萎病。在欧洲、北美、南美、亚洲和大洋洲等多个国家和地区广泛分布，热带、亚热带、温带地区均有发生。属于欧洲及地中海植物保护组织 (EPPO) A2 类检疫性有害生物，同时也是中国进境植物检疫性有害生物。因此灵敏快捷地检测番茄斑萎病毒具有重要的意义。本产品就是为满足此需求而开发的、专门检测番茄斑萎病毒的常规 RT-PCR 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. 产品经过精心优化，分析灵敏性能到达 E2 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，引物是根据番茄斑萎病毒 RNA 高度保守区设计，只能检测番茄斑萎病毒，不会跟除此之外的其他生物的 RNA 发生交叉反应。 5. 涵盖性广，可以精准检测番茄斑萎病毒。 6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的 RT-PCR 反应。 7. 本产品只能用于定性实验，不能用于定量实验。 8. 本产品只能用于科研。		
规格及成分	成 份	编号	五孔盒包装
	5×双酶一管式 RT-PCR Buffer	91202a	200μL (橘黄盖)
	MMLV-Taq Mix	91202b	75μL (红盖)
	超纯水	100935	1mL (紫盖)
	番茄斑萎病毒 RT-PCR 引物混合液	yw13-4640	100μL (白盖)
	番茄斑萎病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc4640-	50μL (黄盖)

		MW519244									
	使用手册	13-4640sc	1 份								
	注：为避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供专一的 DNA 片段作为阳性对照。如果需要 RNA 片段作为阳性对照的需要单独定制。										
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、样品 RNA 的制备 1. 如果有 N 个样品，必须设置 N+2 个提取反应，多出的两个中一个是 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 试剂盒提供的 RT-PCR 阳性对照（1×10E7 拷贝/μL）的 10000 倍稀释液（1×10E4 拷贝/μL）再加上一定量的水作为制备的阳性对照（加水后其总体积跟样品一样，样品体积多少取决于所用试剂盒的要求）。可以用水作为制备的阴性对照。 2. 用自选方法纯化上述 N+2 个样品的 RNA。本试剂盒跟市场上大多数样品 RNA 提取试剂盒兼容，也可以选用本公司的相关的核酸提取试剂盒。 二、设置 RT-PCR 反应（20μL 体系） 3. 标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 RNA 样品，额外增加的两个管一个用于 RT-PCR 阳性对照，另一个用于 RT-PCR 阴性对照。按照下表在各 PCR 管中加入下列成分： <table><tr><th>成份</th><th>N+2 个 样品管</th><th>RT-PCR 阴 性对照</th><th>RT-PCR 阳 性对照</th></tr><tr><td>5×双酶一管式 RT-PCR Buffer</td><td>各 4μL</td><td>4μL</td><td>4μL</td></tr></table>			成份	N+2 个 样品管	RT-PCR 阴 性对照	RT-PCR 阳 性对照	5×双酶一管式 RT-PCR Buffer	各 4μL	4μL	4μL
成份	N+2 个 样品管	RT-PCR 阴 性对照	RT-PCR 阳 性对照								
5×双酶一管式 RT-PCR Buffer	各 4μL	4μL	4μL								

	番茄斑萎病毒 RT-PCR 引物混合液	各 2μL	2μL	2μL																			
	制备的 N+2 个 RNA 样品	各 12.5μL	不加	不加																			
	超纯水	不加	12.5μL	不加																			
	第 1 步所得番茄斑萎病毒 RT-PCR 阳性对照的 10000 倍稀释液	不加	不加	12.5μL																			
	MMLV-Taq Mix	1.5μL	1.5μL	1.5μL																			
4. 上机进行 RT-PCR , RT-PCR 反应参数为:																							
	<table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>逆转录</td><td>42℃</td><td>55 分钟</td></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>5 分钟</td></tr><tr><td rowspan="3">PCR 反应 (30 个循环)</td><td>94℃</td><td>60 秒</td></tr><tr><td>52℃</td><td>60 秒</td></tr><tr><td>72℃</td><td>60 秒</td></tr><tr><td>延伸</td><td>72℃</td><td>10 分钟</td></tr></table>				过程	温度	时间	逆转录	42℃	55 分钟	预变性	95℃	5 分钟	PCR 反应 (30 个循环)	94℃	60 秒	52℃	60 秒	72℃	60 秒	延伸	72℃	10 分钟
过程	温度	时间																					
逆转录	42℃	55 分钟																					
预变性	95℃	5 分钟																					
PCR 反应 (30 个循环)	94℃	60 秒																					
	52℃	60 秒																					
	72℃	60 秒																					
延伸	72℃	10 分钟																					
三、电泳分析																							
	5. 取 10uL 扩增产物进行常规琼脂糖电泳 , 检测扩增效果 , 由于扩增产物较短 , 建议用 1.5%-2.0%的琼脂糖凝胶。																						
	6. 阳性样品预期得到的扩增产物长度为 84bp。如果两个阴性对照 (样品制备阴性对照或 RT-PCR 阴性对照) 有此扩增产物 , 说明环境污染 , 则整个实验无效 , 不需要分析实验结果。																						
	7. 如果所有样品和 RT-PCR 阳性对照均无此扩增产物 , 则说明有系统性的问题 (试剂 , 设备 , 程序 , 操作等) , 需要重复并排查原因。																						
	8. 如果没有上述两种情况 , 则实验有效 , 可以分析样品的扩增结果。N+2 个																						

	样品中扩增产物的判断为阳性， 无 则判定为阴性。
关联产品	番茄斑萎病毒 RT-PCR 检测试剂盒