

天
净
沙
系
列

CAT#:15-4540K
低温运输, -20℃保存

BINGENE

烟草花叶病毒探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒
Tobacco Mosaic Virus (TMV) Probe RT-PCR Kit

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	烟草花叶病毒（Tobacco Mosaic Virus, TMV）为 RNA 病毒，是烟草花叶病等的病原体，属于 Tobamovirus 群。烟草花叶病和番茄花叶病早为一般所了解。叶上出现花叶症状，生长陷于不良状态，叶常呈畸形。因此快速灵敏诊断具有重要意义。本产品就是以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测烟草花叶病毒的试剂盒，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，引物和探针是根据烟草花叶病毒 RNA 高度保守区设计，不会跟其他病毒的 RNA 发生交叉反应。 5. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 各数量级。 6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 RT-PCR 反应。 7. 本产品只能用于科研。		
规格及成分	成分	编号	五孔盒包装
	探针法 qRT-PCR 缓冲液	190504a	500μL（蓝盖）
	探针法 qRT-PCR 酶混合液	190504b	100μL（红盖）
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL（绿盖）
	烟草花叶病毒探针法 qRT-PCR 引物-探针混合液	yp15-4540	150μL（棕色管）
	烟草花叶病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc4540-AB369276.1	50μL（黄盖）
	使用手册	15-4540sc	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 10E1-10E6 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 6，5，4，3，2，1。 2. 用带芯枪头分别加入 45μL 荧光 RT-PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。 3. 在 6 号管中加入 5μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震		

	荡 1 分钟，得 1×10^6 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 $5\mu\text{L}$ 1×10^6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 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 $5\mu\text{L}$ 1×10^5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^4 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 $10\mu\text{L}$ 上步所得 4 号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（$20\mu\text{L}$ 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 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-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 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 RT-PCR 阳性对照（直接用第 6 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。 10. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一重复。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）：																														
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th><th>样品管 N+2 个</th><th>RT-PCR 阴性对照</th><th>标准曲线样品管 (1-6 管)</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>探针法 qRT-PCR 缓冲液</td><td>各 $10\mu\text{L}$</td><td>$10\mu\text{L}$</td><td>各 $10\mu\text{L}$</td></tr> <tr> <td>探针法 qRT-PCR 酶混合液</td><td>各 $2\mu\text{L}$</td><td>$2\mu\text{L}$</td><td>各 $2\mu\text{L}$</td></tr> <tr> <td>烟草花叶病毒 RT-PCR 引物-探针混合液</td><td>各 $3\mu\text{L}$</td><td>$3\mu\text{L}$</td><td>各 $3\mu\text{L}$</td></tr> <tr> <td>N+2 个待测 RNA 样本</td><td>各 $5\mu\text{L}$</td><td>不加</td><td>不加</td></tr> <tr> <td>超纯水</td><td>不加</td><td>$5\mu\text{L}$</td><td>不加</td></tr> <tr> <td>第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)</td><td>不加</td><td>不加</td><td>各 $5\mu\text{L}$ (1 号样到 1 号管，2 号样到 2 号管…)</td></tr> </tbody> </table>			成分	样品管 N+2 个	RT-PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)	探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 $10\mu\text{L}$	$10\mu\text{L}$	各 $10\mu\text{L}$	探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 $2\mu\text{L}$	$2\mu\text{L}$	各 $2\mu\text{L}$	烟草花叶病毒 RT-PCR 引物-探针混合液	各 $3\mu\text{L}$	$3\mu\text{L}$	各 $3\mu\text{L}$	N+2 个待测 RNA 样本	各 $5\mu\text{L}$	不加	不加	超纯水	不加	$5\mu\text{L}$	不加	第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 $5\mu\text{L}$ (1 号样到 1 号管，2 号样到 2 号管…)
成分	样品管 N+2 个	RT-PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)																												
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 $10\mu\text{L}$	$10\mu\text{L}$	各 $10\mu\text{L}$																												
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 $2\mu\text{L}$	$2\mu\text{L}$	各 $2\mu\text{L}$																												
烟草花叶病毒 RT-PCR 引物-探针混合液	各 $3\mu\text{L}$	$3\mu\text{L}$	各 $3\mu\text{L}$																												
N+2 个待测 RNA 样本	各 $5\mu\text{L}$	不加	不加																												
超纯水	不加	$5\mu\text{L}$	不加																												
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 $5\mu\text{L}$ (1 号样到 1 号管，2 号样到 2 号管…)																												

	11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 RT-PCR：		
	过程	温度	时间
	逆转录	50℃	30 min
	预变性	95℃	10 min
	RT-PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec
60℃		1 min（采集 FAM 通道的荧光信号）	
	五、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 35。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。		
关联产品	烟草花叶病毒探针法荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒		