

## 大豆花叶病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒

### Tobacco Mosaic Virus (TMV) Probe RT-PCR Kit

**CAT#: BN64829**

**低温运输, -20℃保存**

| <b>产品及特点</b>                                     | <p>大豆花叶病毒 (Soybean Mosaic Virus, SMV) 引起大豆花叶病, 该病毒主要为害叶片。该病症状因寄主品种、病毒株系、侵染时期和环境条件的不同差别很大, 典型症状为植株矮化, 叶片呈黄绿相间的花叶并皱缩, 叶缘下卷或叶片扭曲, 质地硬脆, 叶脉变褐, 有时沿叶脉两侧有许多疱状突起。 [大豆花叶病是世界各地大豆上普遍发生的一种重要病毒病害。该病在美国、巴西、中国、阿根廷等大豆主产国均为影响产量的重要因素。该病不仅引起减产, 还使质量下降, 所导致的种皮斑驳形成褐斑粒, 使商品豆降价, 影响出口。 所以快速准确诊断大豆花叶病毒具有重要意义。本产品就是为这一目的开发, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 即开即用, 用户只需要提供样品 RNA 模板。</li> <li>2. 引物和探针经过优化, 分析灵敏性高。</li> <li>3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。</li> <li>4. 特异性高, 引物和探针是根据大豆花叶病毒 RNA 高度保守区设计, 不会跟其他病毒的 RNA 发生交叉反应。</li> <li>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。</li> <li>6. 本产品足够 50 次 20 <math>\mu</math>L 体系的探针法荧光定量 RT-PCR 反应。</li> <li>7. 本产品只能用于科研。</li> </ol> |  |    |    |    |                                   |       |        |                                |       |        |                |       |      |                            |         |             |  |         |            |      |  |     |  |  |
|--|---|--|----|----|----|-----------------------------------|-------|--------|--------------------------------|-------|--------|----------------|-------|------|----------------------------|---------|-------------|--|---------|------------|------|--|-----|--|--|
| <b>规格及成分</b>                                     |   | <table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2<math>\times</math>Probe qRT-PCR MagicMix</td> <td>60001</td> <td>0.5 mL</td> </tr> <tr> <td>10<math>\times</math>Probe qRT-PCR 酶混合液</td> <td>60002</td> <td>0.5 mL</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>60003</td> <td>1 mL</td> </tr> <tr> <td>大豆花叶病毒探针法 qRT-PCR 引物-探针混合液</td> <td>64829-4</td> <td>150 <math>\mu</math>L</td> </tr> <tr> <td>大豆花叶病毒 RT-PCR 阳性对照 (1<math>\times</math>10E7 拷贝/<math>\mu</math>L)</td> <td>64829-5</td> <td>50 <math>\mu</math>L</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td></td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table> | 成分 | 编号 | 包装 | 2 $\times$ Probe qRT-PCR MagicMix | 60001 | 0.5 mL | 10 $\times$ Probe qRT-PCR 酶混合液 | 60002 | 0.5 mL | 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 60003 | 1 mL | 大豆花叶病毒探针法 qRT-PCR 引物-探针混合液 | 64829-4 | 150 $\mu$ L | 大豆花叶病毒 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E7 拷贝/ $\mu$ L) | 64829-5 | 50 $\mu$ L | 使用手册 |  | 1 份 |  |  |
| 成分   | 编号  | 包装   |    |    |    |                                   |       |        |                                |       |        |                |       |      |                            |         |             |  |         |            |      |  |     |  |  |
| 2 $\times$ Probe qRT-PCR MagicMix                | 60001   | 0.5 mL   |    |    |    |                                   |       |        |                                |       |        |                |       |      |                            |         |             |  |         |            |      |  |     |  |  |
| 10 $\times$ Probe qRT-PCR 酶混合液                   | 60002   | 0.5 mL   |    |    |    |                                   |       |        |                                |       |        |                |       |      |                            |         |             |  |         |            |      |  |     |  |  |
| 荧光 PCR 专用模板稀释液                                   | 60003   | 1 mL   |    |    |    |                                   |       |        |                                |       |        |                |       |      |                            |         |             |  |         |            |      |  |     |  |  |
| 大豆花叶病毒探针法 qRT-PCR 引物-探针混合液                       | 64829-4   | 150 $\mu$ L  |    |    |    |                                   |       |        |                                |       |        |                |       |      |                            |         |             |  |         |            |      |  |     |  |  |
| 大豆花叶病毒 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E7 拷贝/ $\mu$ L) | 64829-5   | 50 $\mu$ L   |    |    |    |                                   |       |        |                                |       |        |                |       |      |                            |         |             |  |         |            |      |  |     |  |  |
| 使用手册   |   | 1 份  |    |    |    |                                   |       |        |                                |       |        |                |       |      |                            |         |             |  |         |            |      |  |     |  |  |
| <b>运输及保存</b>                                     | 低温运输, -20℃保存, 保存期限为 12 个月。  |  |    |    |    |                                   |       |        |                                |       |        |                |       |      |                            |         |             |  |         |            |      |  |     |  |  |

本产品仅用于科研

|      |   |
|------|---|
| 自备试剂 | 样品 RNA。   |
| 使用方法 | <p>一、<b>稀释标准曲线样品</b>（以 <math>10E1-10E6</math> 拷贝/<math>\mu L</math> 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。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 标记 6 个离心管，分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。</li> <li>2. 用带芯枪头分别加入 45 <math>\mu L</math> 荧光 RT-PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。</li> <li>3. 在 6 号管中加入 5 <math>\mu L</math> <math>1 \times 10E7</math> 拷贝/<math>\mu L</math> 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 <math>1 \times 10E6</math> 拷贝/<math>\mu L</math> 的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 <math>\mu L</math> <math>1 \times 10E6</math> 拷贝/<math>\mu L</math> 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 <math>1 \times 10E5</math> 拷贝/<math>\mu L</math> 的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 <math>\mu L</math> <math>1 \times 10E5</math> 拷贝/<math>\mu L</math> 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 <math>1 \times 10E4</math> 拷贝/<math>\mu L</math> 的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>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。</li> </ol> <p>二、<b>样品 RNA 的制备</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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 <math>\mu L</math> 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。</li> <li>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。</li> </ol> <p>三、<b>Probe qRT-PCR 反应（20 <math>\mu L</math> 体系，在样品制备室进行）</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> </ol> |

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）：

| 成分                          | 样品管<br>N+2 个 | RT-PCR 阴<br>性对照 | 标准曲线样品管<br>(1-6 管)                      |
|-----------------------------|--------------|-----------------|---|
| 2×Probe qRT-PCR MagicMix    | 各 10 μL      | 10 μL           | 各 10 μL                                 |
| 大豆花叶病毒 RT-PCR<br>引物-探针混合液   | 各 3 μL       | 3 μL            | 各 3 μL                                  |
| N+2 个待测 RNA 样本              | 各 5 μL       | 不加              | 不加                                      |
| 超纯水                         | 不加           | 5 μL            | 不加                                      |
| 第 6 步所得标准曲线样品稀释液<br>(1-6 号) | 不加           | 不加              | 各 5 μL(2 号样到<br>2 号管, 3 号样到<br>3 号管...) |
| 10×Probe qRT-PCR 酶混合液       | 各 2 μL       | 2 μL            | 2 μL                                    |

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                   | 42℃ | 30 min                |
| 预变性                   | 95℃ | 3 min                 |
| RT-PCR 反应<br>(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

大豆花叶病毒探针法荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒（含内参）