

狂犬病病毒通用探针法qRT-PCR试剂盒

Rabies Virus Probe qRT-PCR Kit

CAT#:BN64426

低温运输, -20℃保存

产品及特点	狂犬病病毒（Rabies Virus, RV）属于弹状病毒科狂犬病毒属，为 RNA 病毒，它是引起狂犬病的病原体。狂犬病毒会引发狂犬病，属于人畜共患的传染病。 由于该病毒能对人体健康造成严重损害，因此狂犬病病毒的快速准确鉴定对该病的预防和检疫有着重要作用。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狂犬病病毒通用的试剂盒，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，引物是根据狂犬病病毒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。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20 μL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	本产品采用五孔盒包装 <table><tr><td>成分</td><td>编号</td><td>规格</td></tr><tr><td>探针法qRT-PCR缓冲液</td><td>60001</td><td>500 μL</td></tr><tr><td>探针法qRT-PCR酶混合液v2</td><td>60002</td><td>50 μL</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>狂犬病病毒通用qRT-PCR引物-探针干粉</td><td>64426-4</td><td>50次</td></tr><tr><td>狂犬病病毒通用 qRT-PCR阳性对照(1E7 拷贝/μL)</td><td>64426-5</td><td>50 μL</td></tr></table> 注意：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 μL的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。	成分	编号	规格	探针法qRT-PCR缓冲液	60001	500 μL	探针法qRT-PCR酶混合液v2	60002	50 μL	荧光PCR专用模板稀释液	60003	1 mL	狂犬病病毒通用qRT-PCR引物-探针干粉	64426-4	50次	狂犬病病毒通用 qRT-PCR阳性对照(1E7 拷贝/μL)	64426-5	50 μL
成分	编号	规格																	
探针法qRT-PCR缓冲液	60001	500 μL																	
探针法qRT-PCR酶混合液v2	60002	50 μL																	
荧光PCR专用模板稀释液	60003	1 mL																	
狂犬病病毒通用qRT-PCR引物-探针干粉	64426-4	50次																	
狂犬病病毒通用 qRT-PCR阳性对照(1E7 拷贝/μL)	64426-5	50 μL																	
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。																		

本产品仅用于科研

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以1E1-1E6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。如果需要RNA阳性样品，需要另外订购。

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45 μL荧光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5 μL 1E7拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得1E6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 μL 1E6拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1E5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 μL 1E5拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1E4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 μL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RNA提取试剂盒兼容，也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qRT-PCR反应（20 μL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 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 μ L	10 μ L	各10 μ L
探针法qRT-PCR酶混合液v2	各1 μ L	1 μ L	各1 μ L
狂犬病病毒通用探针法 qRT-PCR引物-探针混合液	各3 μ L	3 μ L	各3 μ L
N+2个待测RNA样本	各6 μ L	不加	不加
超纯水	不加	6 μ 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6 μ L (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RT-PCR:

过程	温度	时间
逆转录	50 $^{\circ}$ C	10 min
预变性	95 $^{\circ}$ C	10 min
PCR反应	95 $^{\circ}$ C	15 sec
(45个循环)	60 $^{\circ}$ C	60 sec (采集FAM通道的荧光信号, 淬灭基团为BHQ1)

注: 部分 (如: 伯乐CFX96) 机型如果两步法效果不理想可采用三步法: 50 $^{\circ}$ C 10分钟, 95 $^{\circ}$ C 10分钟, (94 $^{\circ}$ C 15秒、55 $^{\circ}$ C 15秒、72 $^{\circ}$ C 30秒) 循环45次, 每个循环第三步采集荧光信号。

四、数据处理

- 如果样本制备阳性对照或RT-PCR阳性对照(包括标曲样本)结果为阴性, 则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要重新样本制备, 重新进行RT-PCR扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或RT-PCR阴性对照结果为阳性, 说明环境污染, 则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要跟厂家联系。
- 如果阴性对照和阳性对照均正常, 则实验有效, 可以进入后续分析。
- 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。
- 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必须没有读数, 或者大于或等于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45。对待测样品, 如果其Ct没有读数、大于或等于45则均为阴性, 如果小

	于45则为阳性。
--	----------