

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

产品及特点	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： 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。 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 个数量级。 6. 本产品足够 50 次 20 μL 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	包装	
		2×Probe qRT-PCR MagicMix	60001	0.5 mL	
		10×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 μL	
		大豆花叶病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/ μL)	64829-5	50 μL	
		使用手册		1 份	
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。				

本产品仅用于科研

TEL: 010-62960866 www.biorigin.Ltd

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 45 μL 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 5 μL $1 \times 10E7$ 拷贝/μL 的阳性对照 (试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E6$ 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 $1 \times 10E6$ 拷贝/μL 的阳性对照 (上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E5$ 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 $1 \times 10E5$ 拷贝/μL 的阳性对照 (上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E4$ 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 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)
2×Probe qRT-PCR MagicMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
大豆花叶病毒 RT-PCR 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 (1-6 号)	不加	不加	各 5 μL(2 号样到 2 号管, 3 号样到 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	95℃	15 sec
(45 个循环)	60℃	1 min(采集 FAM 通道的荧光信号)

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 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）