

禽轮状病毒染料法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

咨询 QQ : [2881498726](https://www.qq.com)

订购热线 : [021 - 54720761](tel:021-54720761)

咨询电话 : [13166274233\(微信同号\)](https://www.weixin.com)

产品及特点:

禽轮状病毒(Avian Rotavirus, ARV)会引起鸡轮状病毒病, 患鸡在临床症状上差异较大, 从非常轻微的腹泻到病鸡精神委顿、嗜睡、爆发性腹泻下痢、病鸡脱水, 废食。感染禽群的发病率高, 死亡率约 4%~20%。幸存者则生长缓慢。产蛋鸡群感染病毒 4~9 天后, 产蛋量下降。本病的防治主要是通过消毒及饲养管理来防控, 目前尚无有效的药物进行治疗, 也没有研制出疫苗, 因此灵敏快捷的诊断产品具有重要的意义。本产品基于 PCR 原理开发。

1. 一站式, 用于不需要单独准备每种成分, 包括引物和对照。
2. 根据禽轮状病毒的保守基因序列设计的引物, 具有良好的特异性。
3. 基于染料法 qRT-PCR 检测, 灵敏度比常规 RT-PCR 高 10-100 倍, 可以达到至少 1000 拷贝/反应。
4. 使用一管式 qRT-PCR 技术, RT 和 PCR 两步在一个试管内完成, 不需要中间转移样品, 降低了操作误差和可能的污染。
5. 本产品足够 50 次 30 μ L 体系的 RT-PCR。

规格及成分:

| 编号 | 成分 | 规格 |
|-----|--------------------------|------------------|
| 试剂一 | 2 \times qRT-PCR 缓冲液 | 500 μ L(棕色管) |
| 试剂二 | 10 \times qRT-PCR 酶混合液 | 100 μ L(红盖) |

| | | |
|-----|--|-----------------|
| 试剂三 | ROX 染料 I, 50× | 20 μ L(棕色管) |
| 试剂四 | ROX 染料 II, 50× | 20 μ L(棕色管) |
| 试剂五 | 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 1mL(黄盖) |
| 试剂六 | 禽轮状病毒染料法 qRT-PCR 引物混合液 | 100 μ L(白盖) |
| 试剂七 | 禽轮状病毒染料法 qRT-PCR 阳性对照 (1×10^8 拷贝/ μ L) | 50 μ L(黄盖) |
| 试剂八 | 沙核酸释放剂(试用装) | 20 次(1mL, 绿盖) |
| 试剂九 | 使用手册 | 1 份 |

运输及保存:

低温运输、 -20°C 保存, 有效期一年。

阳性对照需要因易污染其他成分需要单独放置。本产品不提供活体样品做阳性对照, 只提供 DNA 片段作为阳性对照。

自备试剂:

样品 RNA

使用方法:

一、稀释阳性对照:

以 10^2 - 10^7 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。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原。

1. 标记 6 个离心管, 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。用带芯枪头分别加入 45 μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液, 最好用带芯枪头, 下同)。
2. 在 7 号管中加入 5 μ L 1×10^8 拷贝/ μ L 的阳性对照(本试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^7 拷贝/ μ L 的阳性对照。放冰上待用。
3. 换枪头, 在 6 号管中加入 5 μ L 1×10^7 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^6 拷贝/ μ L 的阳性对照。放冰上待用。

4. 换枪头, 在 5 号管中加入 5 μL 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 的阳性对照。放冰上待用。重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备:

5. 如果有 N 个样品, 必须设置 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 上步制备的阳性对照梯度稀释液中的第 4 号(浓度为 1×10^4 拷贝/ μL , 10 μL 相当于 1 万拷贝)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。

6. 用自选方法纯化 N+2 个样品的 RNA, 本试剂盒跟市场上大多数病毒 RNA 提取试剂盒兼容。

三、设置 RT-PCR 反应(20 μL 体系, 在样品制备室进行):

7. 如果做定量分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+9 个 PCR 管, 其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品, 1 个用于 PCR 阴性对照, 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 PCR 管, 其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品, 1 个用于 PCR 阴性对照(用水做模板), 1 个用于 PCR 阳性对照(用第 4 号阳性对照稀释液做模板)。下面只描述定量分析的步骤, 定性分析只是把 6 个标曲反应缩减成 1 个, 其余不变。

8. 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, 阳性对照样品要等所有管子盖上盖子后最后加):

| 成分 | N+2 个制备所得样品 | qRT-PCR 阴性对照 | qRT-PCR 阳性对照 (2-7 管) |
|----|-------------|--------------|----------------------|
|----|-------------|--------------|----------------------|

| | | | |
|----------------------------|-------|-------|---|
| 2×qRT-PCR 缓冲液 | 10μL | 10 μL | 各 10 μL |
| 禽轮状病毒染料法 qRT-PCR 引物混合物 | 2 μL | 2 μL | 各 2 μL |
| 50×ROX (见注) | 0.4μL | 0.4μL | 各 0.4μL |
| 样品制备所得 RNA 模板 (来于第 8 步) | 5.6μL | -- | -- |
| 稀释所得 6 个阳性对照 (来于第 6 步) | -- | -- | 各 5.6μL(2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号 管...) |
| 超纯水 | -- | 5.6μL | -- |
| 10×qRT-PCR 酶混合液 | 2μL | 2μL | 2μL |

注： 需使用 ROX 染料 I 的机型：ABI Prism7000、7300、7700、7900HT、
Step-One、Step-One Plus。

需使用 ROX 染料 II 的机型：：ABI Prism 7500、7500Fast、MJ Research 的
Chromo4、Opticon(II)Corbett Rotor Gene 3000。

不需要使用 ROX 的机型：Thermal Cycle Dice Real Time System, LightCycler、Smart
Cycler System、Agilent Mx3000P、RotorGene3000、RotorGene 6000。

9. 上机后按下面参数进行 RT-PCR(参数可能会因仪器不同而需优化)。

| 过程 | 温度 | 时间 |
|--------------------|------|------------------------|
| RT(逆转录) | 50°C | 15-30 min |
| 预变性 | 95°C | 5 min |
| Qrt-PCR 反应(40 个循环) | 95°C | 15 sec |
| | 58°C | 1 min,(采集 FAM 通道的荧光信号) |
| 按仪器预设程序进行溶解曲线分析 | | |

四、数据处理：

10. 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 DNA 浓度的 log 值，再
推算出其浓度。

11. 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 30。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。

所有产品仅供科研使用, 不得用于其他用途。