



辣椒轻斑驳病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒

Pepper Mild Mottle Virus Probe qRT-PCR Kit

货号: JLC_Y7410

使

用

说

明

书

<p>产品及特点</p>	<p>辣椒轻斑驳病毒 (Pepper Mild Mottle Virus, PMMoV) 是一种影响辣椒作物的植物病原性病毒, 属于烟草花叶病毒科。该病毒是一种单链正义 RNA 病毒, 基因长度约为 6.4 knt。这种病毒在全球范围内对甜椒、辣椒和观赏辣椒品种构成严重威胁, 导致产量和品质下降。辣椒轻斑驳病毒的典型症状包括叶片褪绿、发育不良、果实结构扭曲和块状。其传播途径主要包括机械传播和通过受感染的种子传播。由于该病毒一旦感染植物就无法治疗, 因此控制这种疾病的方法是使用经过病原体检测 and 处理的种子进行种植。因此快速灵敏诊断辣椒轻斑驳病毒具有重要意义。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辣椒轻斑驳病毒的含内参试剂盒, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 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, 便于制备标准曲线和用作扩增对照, 排除假阴性结果。 4. 含识别内源性内参的引物和探针, 便于排除 RT-PCR 假阴性样本。 5. 特异性高, 靶分子的引物和探针是根据辣椒轻斑驳病毒 RNA 高度保守区设计, 不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。 6. 既可用于定性检测, 又可用于定量检测。定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。 7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 RT-PCR 反应。 8. 本产品只能用于科研。 																													
	<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>规格</th> <th>包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>探针法 qRT-PCR 缓冲液</td> <td>500 μL</td> <td>0.5 mL 蓝盖管</td> </tr> <tr> <td>探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2</td> <td>50 μL</td> <td>0.5 mL 红盖管</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>1 mL</td> <td>1.5 mL 绿盖管</td> </tr> <tr> <td>辣椒轻斑驳病毒 RT-PCR 引物-探针干粉 (含内参引物探针)</td> <td>50 次</td> <td>0.5 mL 棕色管</td> </tr> <tr> <td>辣椒轻斑驳病毒 RT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)</td> <td>50 μL</td> <td>0.5 mL 黄盖管</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>1 份</td> <td>1 份</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">本产品采用五孔盒包装</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> <p>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 220 μL 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20$^{\circ}$C保存。</p> </td> </tr> </tbody> </table>	成分	规格	包装	探针法 qRT-PCR 缓冲液	500 μ L	0.5 mL 蓝盖管	探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	50 μ L	0.5 mL 红盖管	荧光 PCR 专用模板稀释液	1 mL	1.5 mL 绿盖管	辣椒轻斑驳病毒 RT-PCR 引物-探针干粉 (含内参引物探针)	50 次	0.5 mL 棕色管	辣椒轻斑驳病毒 RT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5 mL 黄盖管	使用手册	1 份	1 份	本产品采用五孔盒包装			<p>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 220 μL 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20$^{\circ}$C保存。</p>			
成分		规格	包装																											
探针法 qRT-PCR 缓冲液		500 μ L	0.5 mL 蓝盖管																											
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2		50 μ L	0.5 mL 红盖管																											
荧光 PCR 专用模板稀释液		1 mL	1.5 mL 绿盖管																											
辣椒轻斑驳病毒 RT-PCR 引物-探针干粉 (含内参引物探针)		50 次	0.5 mL 棕色管																											
辣椒轻斑驳病毒 RT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/ μ L)		50 μ L	0.5 mL 黄盖管																											
使用手册		1 份	1 份																											
本产品采用五孔盒包装																														
<p>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 220 μL 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20$^{\circ}$C保存。</p>																														

使用方法

一、稀释标准曲线样品 (以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/ μ L 这 6 个 10 倍稀释度为例)。

1. 标记 6 个离心管, 分别为 6、5、4、3、2、1。
2. 在各管中加入 45 μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液。
3. 在 6 号管中加入 5 μ L 1E7 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1E6 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 5 号管中加入 5 μ L 1E6 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E5 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 4 号管中加入 5 μ L 1E5 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E4 拷贝/ μ L 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阳性样品。放冰上待用。

二、样品 RNA 的制备

7. 如果有 N 个样品, 设置 N+2 个提取, 多出的一个是制备 PC (样品制备阳性对照), 一个是制备 NC (样品制备阴性对照)。可以用确认是阳性的样本作为阳性对照, 用确认是阴性的样本作为阴性对照。
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 μ 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 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) :

成分	样品管	RT-PCR	标准曲线样品管
----	-----	--------	---------

	N+2 个	阴性对照	(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
辣椒轻斑驳病毒 PCR 引物-探针混合液(含内参引物和探针)	各 4 μ L	4 μ L	各 4 μ L
N+2 个待测样 (含内源性内参)	各 5 μ L	不加	不加
超纯水	不加	5 μ L	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (含内参, 1-6 号)	不加	不加	各 5 μ L

11. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 qRT-PCR:

过程	温度	时间
逆转录	50°C	10 min.
预变性	95°C	5 min.
PCR 反应 (40 个循环)	95°C	15 sec.
	60°C	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 MGB)

四、数据处理

12. 阴性阳性判断: 没有 Ct 读数, 或 Ct 大于 40 判为阴性结果。有 Ct 读数, Ct 值小于 40, 荧光信号有对数增长, 有典型扩增曲线判为阳性结果。每个样本需要对 FAM 通道和 Cy5 通道的结果分别进行判定, 得到两个结果。

13. 实验有效性判断: 如果扩增阳性对照或制备阳性对照 FAM 通道结果为阴性则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要分析原因, 可能是操作、仪器和试剂三方面的原因, 重做扩增或制备或跟仪器和试剂厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照 FAM 通道结果为阳性, 说明环境污染, 则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要分析失败原因, 直到污染消除。如果阳性对照和阴性对照正

	<p>常，则进入下一步分析样本的有效性。</p> <p>14. 样本有效性判断：如果样本 FAM 通道的结果为阳性，则无论内参通道的结果是阴性还是阳性，样本的结果均有效。如果样本结果为阴性，内参通道结果也为阴性，则此样品的阴性结果无效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。</p> <p>15. 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，分别以阳性对照 FAM 通道和内参通道的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线为斜线，r2 必须大于 0.95，内参通道读数的标准曲线为一条跟 X 轴平行的横线。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。</p> <p>16. 如果用于定性实验，对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 没有读数、或 Ct 大于或等于 40 则均为阴性，如果小于 40 则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的待测样本，如果其对应的内参通道也为阴性，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。</p>
<p>自备试剂</p>	<p>样品 RNA。</p>
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。</p>

生产企业：上海机纯实业有限公司

江蓝纯

jkbio.cn

公司地址：上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603

公司电话：021-54720761

技术支持：13166274223