

# 草鱼呼肠孤病毒 2 型探针法 qRT-PCR 试剂盒

## Grass Carp Reovirus 2 Probe qRT-PCR Kit

目录号: [ml108176](#)

# 使 用 说 明 书

### 产品及特点

草鱼呼肠孤病毒 2 型 (Grass Carp Reovirus 2, GCRV-2) 是一种双链 RNA 病毒, 其对酸碱的耐受能力较强, 可以通过水体或寄生虫传播给健康的草鱼这些易感鱼类。草鱼呼肠孤病毒 2 型是目前已知的毒力强的呼肠孤病毒, 主要引起 1 龄和 2 龄草鱼出血病, 死亡率一般为 30~50%, 甚至可以高达 60~90%。草鱼呼肠孤病毒 2 型不仅能感染草鱼, 还能感染青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*)、麦穗鱼 (*Pseudorasbora parva*)、稀有鮡鲫 (*Gobiocypris rarus*)、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 等。该病毒流行广、在中国、越南、缅甸等亚洲国家都有报道, 同时其具有的危害大、死亡率高、发病季节长等特点, 严重影响了广大养殖者的积极性和我国淡水养殖业的健康发展。因此快速灵敏诊断草鱼呼肠孤病毒 2 型具有重要意义。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草鱼呼肠孤病毒 2 型的含内参试剂盒, **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，分析灵敏性高，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草鱼呼肠孤病毒 2 型 RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。内参的引物和探针根据草鱼给 gig2p 基因设计。
6. 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。
7. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的探针法 RT-PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

### 规格及成分

成分	规格	包装
探针法 qRT-PCR 缓冲液	500 $\mu$ L	0.5mL 蓝盖管
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	50 $\mu$ L	0.5mL 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
草鱼呼肠孤病毒 2 型 RT-PCR 引物-探针干粉 (含内参引物探针)	50 次	0.5mL 棕盖管
草鱼呼肠孤病毒 2 型 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10 <sup>7</sup> 拷贝/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L	0.5mL 黄盖管
使用手册	1 份	无
本产品使用五孔盒包装		
<p><b>注意:</b> 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 216<math>\mu</math>L 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20<math>^{\circ}</math>C保存。</p>		

### 使用方法

- 一、稀释标准曲线样品** (以阳性对照 10E1-10E6 拷贝/ $\mu$ 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 $\mu$ L 荧光 PCR 专用模板稀释液。
3. 在 6 号管中加入 5  $\mu$ L  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu$ 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  $\mu$ L  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu$ 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  $\mu$ L  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu$ 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 $\mu$ 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 N+2 个	RT-PCR 阴性对	标准曲线样品管(1-6 管)
----	-----------	------------	----------------

		照	
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	各 10 $\mu$ L
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	各 1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	各 1 $\mu$ L
草鱼呼肠孤病毒 2 型 PCR 引物-探针 混合液(含内参引物和探针)	各 4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L
N+2 个待测样 (含内源性内参)	各 5 $\mu$ L	不加	不加
超纯水	不加	5 $\mu$ 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 $\mu$ L

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	10min
预变性	95 $^{\circ}$ C	4min
RT-PCR 反应 (40 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15sec
	60 $^{\circ}$ C	45 sec (采集 FAM 通道和 HEX 通道的荧光信号, 淬灭基团均为 BHQ)

#### 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 HEX 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

	<p>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常，则进入下一步分析样本的有效性。</p> <p><b>14.</b> 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 HEX 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><b>15.</b> 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 HEX 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，<math>r^2</math> 必须大于 0.95，内参 HEX 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><b>16.</b> 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 HEX 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><b>自备试剂</b></p>	<p>样品 RNA。</p>
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。</p>