|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:14-15100****低温运输，-20℃保存** |  |
| **基孔肯尼雅病毒染料法荧光定量RT-PCR试剂盒*Chikungunya Virus(CHIKV) SYBR qRT-PCR Kit*** |
| **使用手册V1.0** |
| **北京克必隆分子诊断技术有限公司****网址：[www.bingene.com](http://www.bingene.com)；电话：400-6005850；电邮：order@bingene.com** |
| **产品及特点** | 基孔肯尼雅病毒(Chikungunya Virus，CHIKV)是一种RNA病毒，会引起基孔肯雅病，发热病人常突然起病，寒战、发热，体温可达39℃，伴有头痛、恶心、呕吐、食欲减退，淋巴结肿大。一般发热1~7天即可退热，约3天后再次出现较轻微发热，持续3~5天恢复正常，有些患者可有结膜充血和轻度结膜炎表现，关节疼痛与发热同时，患者全身的多个关节和脊椎出现十分剧烈的疼痛，且病情发展迅速，往往在数分钟或数小时内关节功能丧失，不能活动，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。它具有下列特点：1. 一站式，用于不需要单独准备每种成分，只需要提供RNA样品。
2. 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100拷贝/反应。
3. 根据基孔肯尼雅病毒的保守基因序列设计的引物，具有良好的特异性，不会跟其它生物的RNA发生交叉反应。
4. 涵盖性好，能扩增检测出基孔肯尼雅病毒的大多数亚型。
5. 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。
6. 本产品既可用于定性检测，也可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少有5个数量级。
7. 本产品足够50次20μL体系的RT-PCR反应
8. 只能用于科研，不能用于临床。
 |
| **规格及成分** |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 成分 | 编号 | 五孔盒包装 |
| 2×染料法qRT-PCR 缓冲液 | 190101a | 500μL（棕色管） |
| 10染料法×qRT-PCR酶混合液 | 190101b | 100μL（红盖） |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 180701 | 1mL（绿盖） |
| 基孔肯尼雅病毒RT-PCR引物混合液 | yw14-15100 | 100μL（白盖） |
| 基孔肯尼雅病毒RT-PCR阳性对照(1×10E7拷贝/μL) | pc15100-LT964970.1 | 50μL（黄盖） |
| 使用手册 | 14-15100sc | 1份 |

 |
| **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、超纯水、10×ROX（根据机型决定，具体见使用方法）。 |
| **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）。本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供RNA片段作为阳性对照。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）。1. 标记5个离心管，分别为6，5，4，3，2,1。
2. 用带芯枪头分别加入45μL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5μL 1×10E7拷贝/μL的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得1×10E6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5μL 1×10E6拷贝/μL的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E5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5μL 1×10E5拷贝/μL的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E4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**1. 如果有N个样品，最好设置N+2个提取，多出的一个是样品制备PC（样品制备阳性对照），一个是样品制备NC（样品制备阴性对照）。可以用10μL阳性对照的10000倍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，以此作为样品制备PC。另外用水作为样品制备NC。
2. 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核酸提取试剂盒兼容。

**三、设置RT-PCR反应（20μL体系，在样品制备室进行）**1. 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（用水做模板），5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（用试剂盒提供的阳性对照的10000倍稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
2. 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** | **PCR阴性对照管** | **标准曲线****样品管（1-6管）** |
| 2×染料法qRT-PCR 缓冲液 | 10μL | 10μL | 各10μL |
| 10染料法×qRT-PCR酶混合液 | 2μL | 2μL | 各2μL |
| 基孔肯尼雅病毒RT-PCR引物混合液 | 2μL | 2μL | 各2μL |
| N+2个待测DNA模板 | 6μL | 不加 | 不加 |
| 超纯水 | 不加 | 6μL | 不加 |
| 第6步所得标准曲线样品稀释液（2-6号） | 不加 | 不加 | 各6μL（1号样到1号管，2号样到2号管…） |

1. 盖上盖子后上机，按下面参数进行RT-PCR：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **过程** | **温度** | **时间** |
| RT（逆转录） | 55℃ | 10min |
| 预变性 | 95℃ | 1min |
| PCR反应（40个循环） | 95℃ | 10S |
| 60℃ | 35S（采集SYBR通道的荧光信号） |
| 按仪器预设程序进行熔解曲线分析 |

**四、数据处理**1. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有Ct值，但Tm值跟阳性对照Tm不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，数据无效，不予以分析。Tm跟阳性对照Tm一致的，为有效Ct。
2. 如果两种阴性对照的溶解曲线所得Tm值跟阳性对照的Tm值一样，说明环境或试剂可能有过去的qRT-PCR扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。
3. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和qRT-PCR阴性对照）是假阳性，可以继续分析其它样品有效数据。
4. 对定量检测，以阳性对照样品的浓度的log值为横轴，以有效Ct值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效Ct值从标准曲线上推算出样品RNA浓度的log值，再换算出待测样品的RNA浓度。
5. 对定性检测，则有有效Ct值的为阳性，无有效Ct值的为阴性。
 |
| **关联产品** | 基孔肯尼雅病毒染料法荧光定量RT-PCR检测试剂盒 |

20210721zh