天
净
沙
系
列

CAT#:14-15100
低温运输, -20℃保存

BINGENE

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; 电话: 400-6005850; 电邮:

order@bingene.com

<p>产品及特点</p>	<p>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:</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。 																							
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>五孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×染料法 qRT-PCR 缓冲液</td> <td>190101a</td> <td>500μL (棕色管)</td> </tr> <tr> <td>10 染料法×qRT-PCR 酶混合液</td> <td>190101b</td> <td>100μL (红盖)</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>180701</td> <td>1mL (绿盖)</td> </tr> <tr> <td>基孔肯尼雅病毒 RT-PCR 引物混合液</td> <td>yw14-15100</td> <td>100μL (白盖)</td> </tr> <tr> <td>基孔肯尼雅病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)</td> <td>pc15100-LT964970.1</td> <td>50μL (黄盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>14-15100sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			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
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																						
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输, -20℃保存, 保存期限为 12 个月。</p>																							
<p>自备试剂</p>	<p>样品 RNA、超纯水、10×ROX (根据机型决定, 具体见使用方法)。</p>																							
<p>使用方法</p>	<p>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</p>																							

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 45 μ L 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 5 μ L 1×10^7 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^6 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 1×10^6 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 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 1×10^5 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^4 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 10 μ L 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。
8. 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 (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 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。
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	PCR 阴性对照管	标准曲线样品管 (1-6 管)
2 $\times$ 染料法 qRT-PCR 缓冲液	10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
10 染料法 $\times$ qRT-PCR 酶混合液	2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
基孔肯雅病毒 RT-PCR 引物混合液	2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
N+2 个待测 DNA 模板	6 μ L	不加	不加
超纯水	不加	6 μ L	不加

第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (2-6 号)	不加	不加	各 6 μ L (1 号样到 1 号管, 2 号样到 2 号管...)
--------------------------	----	----	---

11. 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 $^{\circ}$ C	10min
预变性	95 $^{\circ}$ C	1min
PCR 反应 (40 个循环)	95 $^{\circ}$ C	10S
	60 $^{\circ}$ C	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

12. 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。
13. 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。
14. 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。
15. 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。
16. 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

基孔肯雅病毒染料法荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒