

天
净
沙
系
列

CAT#:14-15700
低温运输, -20℃保存

BINGENE

肠道病毒 72 型染料法荧光定量 RT-PCR 试剂盒
Enteric Virus-72 SYBR qRT-PCR Kit

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	肠道病毒 72 型 (Enteric Virus-72, EV-72) 会引起甲型肝炎, 故曾名甲型肝炎病毒。甲型肝炎的潜伏期为 15~45 天, 甲肝病毒散发时以小儿为最多, 常表现为食欲减退, 恶心, 厌油, 消化不良等。一旦甲肝出现黄疸, 出发症状开始明显减轻, 胃纳好转, 肝大有肿痛, 部分病例有脾大, 血清胆红素在病后 1-2 周内为最高, 黄疸可持续 2-6 周, 约 1 个月左右即消退, 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, 包括引物和对照。 2. 根据肠道病毒 72 型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 30μL 体系的 RT-PCR。 6. 本产品只能用于科研, 不能用于临床。																							
规格及成分	<table><tr><th>成 份</th><th>编 号</th><th>五孔盒包装</th></tr><tr><td>2×染料法 qRT-PCR 缓冲液</td><td>190101a</td><td>500 uL (棕盖管)</td></tr><tr><td>10×染料法 qRT-PCR 酶混合液</td><td>190101b</td><td>100 uL (红盖管)</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>180701</td><td>1mL (绿盖管)</td></tr><tr><td>肠道病毒 72 型 RT-PCR 引物混合液</td><td>14-15700yw</td><td>100 μL (白盖管)</td></tr><tr><td>肠道病毒 72 型 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)</td><td>14-15700pc</td><td>50 μL (黄盖管)</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>14-15700sc</td><td>1 份</td></tr></table>	成 份	编 号	五孔盒包装	2×染料法 qRT-PCR 缓冲液	190101a	500 uL (棕盖管)	10×染料法 qRT-PCR 酶混合液	190101b	100 uL (红盖管)	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL (绿盖管)	肠道病毒 72 型 RT-PCR 引物混合液	14-15700yw	100 μL (白盖管)	肠道病毒 72 型 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	14-15700pc	50 μL (黄盖管)	使用手册	14-15700sc	1 份		
成 份	编 号	五孔盒包装																						
2×染料法 qRT-PCR 缓冲液	190101a	500 uL (棕盖管)																						
10×染料法 qRT-PCR 酶混合液	190101b	100 uL (红盖管)																						
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL (绿盖管)																						
肠道病毒 72 型 RT-PCR 引物混合液	14-15700yw	100 μL (白盖管)																						
肠道病毒 72 型 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	14-15700pc	50 μL (黄盖管)																						
使用手册	14-15700sc	1 份																						
运输及保存	低温运输, -20℃保存, 保存期限为 12 个月。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 10E1-10E6 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, 千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分)。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原, 本产品不提供活体样品做阳性对照, 只提供无传染性的的 DNA 片段作为阳性对照。 1. 标记 6 个离心管, 分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液, 最好用带芯枪头, 下同)。 2. 在 6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(本试剂盒提供), 充分																							

震荡 1 分钟，得 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。

3. 换枪头，在 5 号管中加入 $5 \mu\text{L}$ 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。

4. 换枪头，在 4 号管中加入 $5 \mu\text{L}$ 1×10^5 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^4 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。

5. 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 RNA 的制备

6. 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 $10\mu\text{L}$ 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 ， $10\mu\text{L}$ 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。

7. 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（ $20\mu\text{L}$ 体系，在样品制备室进行）

8. 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。

9. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一重复。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	RT-PCR 阴性对照	RT-PCR 阳性对照（1-6 管）
$2 \times$ 染料法 qRT-PCR 缓冲液	$10\mu\text{L}$	$10\mu\text{L}$	各 $10\mu\text{L}$
肠道病毒 72 型 RT-PCR 引物混合物	$2\mu\text{L}$	$2\mu\text{L}$	各 $2\mu\text{L}$
样品制备所得 RNA 模板（来于第 6 步）	$6\mu\text{L}$	不加	不加
稀释所得 6 个阳性对照（来于第 5 步）	不加	不加	各 $6\mu\text{L}$ （2 号样到 2 号管，3 号样到 3 号管…）
$10 \times$ 染料法 qRT-PCR	$2\mu\text{L}$	$2\mu\text{L}$	$2\mu\text{L}$

	酶混合液			
--	------	--	--	--

10. 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℃	30 分钟
预变性	94℃	2 分钟
RT - PCR 反应 (30 个循环)	95℃	15 秒
	60℃	15 秒（采集 SYBR 通道的荧光信号）
	72℃	15 秒
按仪器预设程序进行溶解曲线分析		

四、数据处理

11. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。任何样品如果有 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。如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 qRT-PCR 阴性对照）是属于这种情况（有 Ct 值但跟阳性对照的 Tm 不一样），则判为假阳性，不影响样品的分析，可以继续分析其它待测样品的数据。

12. 如果两种阴性对照（样本制备阴性对照和 RT-PCR 阴性对照）有 Ct 值，并且溶解曲线所得 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，没有必要分析待测样品的数据，需要解决污染问题再进行实验。

13. 分析待测样品的数据。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。对定性检测，则有 Ct 值并且 Tm 跟阳性对照一致的为阳性，无 Ct 值或有 Ct 值但 Tm 跟阳性对照不一致的判为阴性。

关联产品	肠道病毒 72 型可视化 RT-LAMP 检测试剂盒
------	----------------------------