|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:14-15700****低温运输，-20℃保存** |  |
| **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**](http://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** |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **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1×10E6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 μL 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的阳性对照。放冰上待用。
4. 换枪头，在4号管中加入5 μL 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**1. 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10μL上步制备的阳性对照梯度稀释液中的第4号（浓度为1×10E4拷贝/μL，10μL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。
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病毒RNA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，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。
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，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×染料法qRT-PCR缓冲液 | 10μL | 10μL | 各10μL |
| 肠道病毒72型RT-PCR引物混合物 | 2μL | 2μL | 各2μL |
|  样品制备所得RNA模板（来于第6步） | 6μL | 不加 | 不加 |
| 稀释所得6个阳性对照（来于第5步） | 不加 | 不加 | 各6μL（2号样到2号管，3号样到3号管…） |
| 10×染料法qRT-PCR酶混合液 | 2μL | 2μL | 2μL |

1. 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 |

1. **数据处理**
2. 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。
3. 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。
4. 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 |

20220301dx