

天
净
沙
系
列

CAT#:14-24820
低温运输, -20℃保存

BINGENE

诺如病毒 G2 型染料法 qRT-PCR 试剂盒

Norwalk Viruses G2 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	诺如病毒 (Norwalk Viruses, NV) 是人类杯状病毒科 (Human Calicivirus, HuCV) 中诺如病毒 (Norovirus, NV) 属的一种病毒。NV 是引起儿童和成人非细菌性急性胃肠炎的重要病因，主要通过粪-口途径传播，与饮用水和食物尤其是贝类的污染密切相关。NV 感染性腹泻在全世界范围内均有流行，全年均可发生感染，感染对象主要是成人和学龄儿童，寒冷季节呈现高发。美国每年在所有的非细菌性腹泻暴发中，60-90%是由 NV 引起。荷兰、英国、日本澳大利亚等发达国家也都有类似结果。在中国 5 岁以下腹泻儿童中，NV 检出率为 15%左右，血清抗体水平调查表明中国人群中诺如病毒的感染亦十分普遍。该病毒是一组形态相似、抗原性略有不同的 RNA 病毒，分为 G (I-V) 五型，感染人的有 GI、GII 和 GIV 型，其中以 GI 型最为常见。NV 是引起儿童和成人非细菌性急性胃肠炎的重要病因，没有疫苗和特效药物，因此灵敏快捷的诊断产品 NV-2 型病毒具有重要的意义。本产品基于染料法 qRT-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. 根据诺如病毒 G2 型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. 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。 6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的 RT-PCR 反应 7. 只能用于科研，不能用于临床。
--------------	---

规格及成分	本产品采用五孔盒包装			
	成份	编号	规格	包装材料
	2×SYBR qRT-PCR 缓冲液	990102a	500 μL	0.5mL 本色管
	10×SYBR qRT-PCR 酶混合液	990102b	100 μL	0.5mL 红盖管
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5mL 绿盖管
	诺如病毒 G2 型 qRT-PCR 引物干粉	yw15-24820tm	50 次	0.5mL 白盖管
	诺如病毒 G2 型 qRT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc15-24820tm	50 μL	0.5mL 黄盖管
	使用手册	14-24820sc	1 份	无
注意：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 110uL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。				
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。阳性对照需要单独放置。			
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）。 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. 换枪头，在 6 号管中加入 5 μL 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

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 μ L 上得到的阳性对照梯度稀释液中的第 4 号（浓度为 1×10^4 拷贝/ μ L，10 μ 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（加水后其总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的样本起始体积一样）。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样品 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、设置 RT-PCR 反应（20 μ 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（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 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 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。
9. 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 $\times$ SYBR qRT-PCR 缓冲液	10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
诺如病毒 G2 型 qRT-PCR 引物混合液	2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
N+2 个 RNA 模板	6 μ L	不加	不加
自备超纯水	不加	6 μ L	不加

6 个阳性对照稀释液	不加	不加	各 6μL (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管…)
10×SYBR qRT-PCR 酶混合液	2μL	2μL	2μL

10. 上机后按下面参数进行 RT-PCR。

过程	温度	时间
RT (逆转录)	50℃	30 分钟
预变性	95℃	2 分钟
PCR 反应 (35 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		

注意：循环次数最好不要超过 35 次。

四、数据处理

11. 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。

12. 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。

13. 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。

14. 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。

15. 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	诺如病毒 G2 型荧光及可视化 RT-LAMP 检测试剂盒
------	-------------------------------

20221221w