|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:14-24900** **低温运输，-20℃保存** |  |
| **人偏肺病毒染料法qRT-PCR试剂盒****Human Metapneumo Virus 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：400-6605850；电邮：order@bingene.com** |
| **产品及特点** | 人偏肺病毒(Human Metapneumo Virus，hMPV)是一种RNA病毒，是一种新近发现的呼吸道致病病毒。感染主要发生在冬春季，各年龄阶段的人群都可受到感染，尤其是儿童、老年人和免疫缺陷患者。世界各国报道其感染率不径相同，感染症状可从轻微的上呼吸道病变到严重的细支气管炎和肺炎，因此人偏肺病毒的快速准确鉴定对该病的预防和检疫有着重要作用。本产品基于PCR原理开发，专门用于检测人偏肺病毒。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. 根据人偏肺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. 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** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 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 |
| 人偏肺病毒RT-PCR引物混合液 | yw14-24900 | 100 μL | 0.5mL白盖管 |
| 人偏肺病毒RT-PCR阳性对照（1×10E7拷贝/μL） | pc14-24900 | 50 μL | 0.5mL黄盖管 |
| 使用手册 | 14-24900sc | 1份 | 无 |

本产品采用五孔盒包装 |
| **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）。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原。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**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，加水后其总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样品体积一样。可以用水作为核酸制备的阴性对照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（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），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。
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×SYBR qRT-PCR 缓冲液 | 10μL | 10μL | 各10μL |
| 人偏肺病毒qRT-PCR引物混合物 | 2μL | 2μL | 各2μL |
|  N+2个RNA模板 | 6μL | 不加 | 不加 |
| 自备超纯水 | 不加 | 6μL | 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 |

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 | 95℃ | 2分钟 |
| RT - 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。1. **数据处理**
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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** | 人偏肺病毒可视化RT-LAMP检测试剂盒 |

20220520wmx