

天
净
沙
系
列

CAT#:14-33400
低温运输, -20℃保存

BINGENE

汉坦病毒染料法 qRT-PCR 试剂盒

Hantavirus (HV) 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: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	汉坦病毒归属布尼亚病毒科，是一种有包膜分节段的负链 RNA 病毒，基因组包括 L、M、S 3 个片段，分别编码 L 聚合酶蛋白、G1 和 G2 糖蛋白、核蛋白。汉坦病毒可两种：引起汉坦病毒肺综合征（HPS），另一种引起汉坦病毒肾综合征出血热（HFRS）。前者主要流行于美国，在阿根廷、巴西、巴拉圭、玻利维亚以及德国也发现了病例。中国虽未发现，但有发生的可能。因此汉坦病毒的快速准确鉴定对该病的预防和检疫有着重要作用。本产品是基于染料法荧光定量 RT-PCR 原理开发，专门检测汉坦病毒的通用试剂盒。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. 根据汉坦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，能扩增检测出汉坦病毒的大多数亚型。 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。																							
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×qRT-PCR 缓冲液</td><td>190101a</td><td>500μL（棕色管）</td></tr><tr><td>10×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>汉坦病毒 qRT-PCR 引物混合液</td><td>yw14-33400</td><td>100μL（白盖）</td></tr><tr><td>汉坦病毒 qRT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)</td><td>pc33400</td><td>50μL（黄盖）</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>14-33400sc</td><td>1 份</td></tr></table>			成 份	编号	五孔盒包装	2×qRT-PCR 缓冲液	190101a	500μL（棕色管）	10×qRT-PCR 酶混合液	190101b	100μL（红盖）	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL（绿盖）	汉坦病毒 qRT-PCR 引物混合液	yw14-33400	100μL（白盖）	汉坦病毒 qRT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc33400	50μL（黄盖）	使用手册	14-33400sc	1 份
成 份	编号	五孔盒包装																						
2×qRT-PCR 缓冲液	190101a	500μL（棕色管）																						
10×qRT-PCR 酶混合液	190101b	100μL（红盖）																						
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL（绿盖）																						
汉坦病毒 qRT-PCR 引物混合液	yw14-33400	100μL（白盖）																						
汉坦病毒 qRT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc33400	50μL（黄盖）																						
使用手册	14-33400sc	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 45μL 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 5μL 1×10^7 拷贝/μL 的阳性对照(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 5μL 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 5μL 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 10μL 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/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。
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 (20μL 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 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×qRT-PCR 缓冲液	10μL	10μL	各 10μL
汉坦病毒 qRT-PCR 引物混合液	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（1 号样到 1 号管，2 号样到 2 号管…）
		10×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℃	10 分钟	
		PCR 反应 (35 个循环)	95℃	15 秒	
			60℃	60 秒（采集 SYBR 通道的荧光信号）	
		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		汉坦病毒染料法 qRT-PCR 检测试剂盒			