

天
净
沙
系
列

CAT#:15-35300
低温运输, -20℃保存

BINGENE

西尼罗病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒

West Nile virus Probe 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	西尼罗病毒(West Nile virus, WNV)属于黄病毒科黄病毒属。它主要通过蚊媒传播，于 1937 年首次分离。WNV 被认为在蚊-鸟-蚊的传播循环过程中增殖，多数种类的鸟类和蚊类都支持病毒的复制，而且大部分鸟类在感染后并不出现明显的症状。人和马被认为是 WNV 的终端宿主，目前报道过的暴发都源自 WNV 的 I 型。哺乳动物感染 WNV 后可出现不同程度和不同症状的临床表现，严重的将影响神经系统，引起西尼罗脑炎。一般情况下，感染 WNV 后的马匹多会出现不同程度的共济失调状况，只有较少数量发生西尼罗脑炎，死亡率大约占发病因此快速灵敏诊断西尼罗病毒具有重要意义。本产品就是以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测西尼罗病毒的试剂盒，它具有下列特点： 1. 即开即用，用户只需要提供样品 RNA 模板。 2. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/μL。 3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。 4. 特异性高，引物是根据西尼罗病毒 RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。 5. 涵盖性好，可以扩增西尼罗病毒的大多数亚型。 6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 各数量级。 7. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。 8. 本产品只能用于科研。																							
规格及成分	<table><tr><th>成分</th><th>编号</th><th>五孔盒包装</th></tr><tr><td>探针法 qRT-PCR 缓冲液</td><td>190504a</td><td>500μL（蓝盖）</td></tr><tr><td>探针法 qRT-PCR 酶混合液</td><td>190504b</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>西尼罗病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液</td><td>yp15-35300</td><td>150μL（棕色管）</td></tr><tr><td>西尼罗病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)</td><td>pc35300-DQ374650.1</td><td>50μL（黄盖）</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>15-35300sc</td><td>1 份</td></tr></table>	成分	编号	五孔盒包装	探针法 qRT-PCR 缓冲液	190504a	500μL（蓝盖）	探针法 qRT-PCR 酶混合液	190504b	100μL（红盖）	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL（绿盖）	西尼罗病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	yp15-35300	150μL（棕色管）	西尼罗病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc35300-DQ374650.1	50μL（黄盖）	使用手册	15-35300sc	1 份		
成分	编号	五孔盒包装																						
探针法 qRT-PCR 缓冲液	190504a	500μL（蓝盖）																						
探针法 qRT-PCR 酶混合液	190504b	100μL（红盖）																						
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL（绿盖）																						
西尼罗病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	yp15-35300	150μL（棕色管）																						
西尼罗病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc35300-DQ374650.1	50μL（黄盖）																						
使用手册	15-35300sc	1 份																						
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。																							
自备试剂	样品 RNA。																							

使用方法	一、稀释标准曲线样品（以 10E1-10E6 拷贝/μL 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 DNA 片段作为阳性对照。如果需要 RNA 阳性样品，需要另外订购。 1. 标记 6 个离心管，分别为 6，5，4，3，2，1。 2. 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）。 3. 在 6 号管中加入 5μL 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 的标准曲线样品。放冰上待用。 4. 换枪头，在 5 号管中加入 5μL 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 的标准曲线样品。放冰上待用。 5. 换枪头，在 4 号管中加入 5μL 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 的标准曲线样品。放冰上待用。 6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。 二、样品 RNA 的制备 7. 如果有 N 个样品，最好设置 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 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。 8. 用自选方法纯化样品的 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 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、Probe qRT-PCR 反应（20μL 体系，在样品制备室进行） 9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 个 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-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 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 RT-PCR 阳性对照（直接用第 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。 10. 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，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后最后加）：
-----------------	--

	成分	样品管 N+2 个	RT-PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)													
	探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10μL	10μL	各 10μL													
	探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2μL	2μL	各 2μL													
	西尼罗病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL													
	N+2 个待测 RNA 样本	各 5μL	不加	不加													
	超纯水	不加	5μL	不加													
	第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 5μL (1 号样 到 1 号管, 2 号 样到 2 号管…)													
	11. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 RT-PCR:																
<table><tr><td>过程</td><td>温度</td><td>时间</td></tr><tr><td>逆转录</td><td>50℃</td><td>30min</td></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>10min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (40 个循环)</td><td>95℃</td><td>15 sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60sec (采集 FAM 通道的荧光信号)</td></tr></table>				过程	温度	时间	逆转录	50℃	30min	预变性	95℃	10min	PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15 sec	60℃	60sec (采集 FAM 通道的荧光信号)
过程	温度	时间															
逆转录	50℃	30min															
预变性	95℃	10min															
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15 sec															
	60℃	60sec (采集 FAM 通道的荧光信号)															
四、数据处理																	
12. 如果把本试剂盒用于定量检测, 则以阳性对照浓度的 log 值为横轴, 以 Ct 值为纵轴, 绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的 log 值, 再推算出其浓度。																	
13. 如果把本试剂盒用于定性检测, 只判断阳性或阴性, 则阴性对照 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长, 有典型扩增曲线, Ct 值应该小于或等于 35。对待测样品, 如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性, 如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间, 则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性, 如果小于 40, 则为阳性。																	
关联产品	西尼罗病毒探针法荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒																