|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:15-46800**  **低温运输，-20℃保存** | |  | |
| **盖塔病毒探针法qRT-PCR试剂盒**  **Getah VirusProbe 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** | | 盖塔病毒(Getah virus, GETV)属于RNA病毒披膜病毒科(Togaviridae)甲病毒属(Alphavirus)成员, 是一种经蚊虫在脊椎动物中传播的虫媒病毒, 广泛分布于东南亚和东亚地区。已证实GETV可引起家畜的疾病, 如日本和印度曾多次发生该病毒感染马或猪而导致的疾病流行，近期我国湖南省某地猪群中也发生盖塔病毒病的流行。GETV血清学调查表明, 人、多种家畜及某些野生动物中也存在该病毒感染, 亚洲、欧洲、大洋洲一些国家的人、猪、马、牛、山羊、犬、兔、袋鼠、鸡和野鸟血清中均检测到GETV病毒抗体，因此快速检测盖塔病毒具有重要的意义。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盖塔病毒的试剂盒，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/反应。 3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。 4. 特异性高，引物是根据盖塔病毒RNA高度保守区设计，不会跟其他生物的RNA发生交叉反应。 5. 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个数量级。 6. 本产品足够50次20μL体系的探针法荧光定量qRT-PCR反应。 7. 本产品只能用于科研。 | |
| **规格及成分** | | |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | 成分 | 编号 | 规格 | 包装材料 | | 探针法qRT-PCR缓冲液 | 990504a | 500μL | 0.5mL（蓝色盖） | | 探针法qRT-PCR酶混合液 | 990504b | 100μL | 0.5mL（红色盖） | | 荧光PCR专用模板稀释液 | 180701 | 1mL | 1.5mL（绿色盖） | | 盖塔病毒qRT-PCR  引物-探针混合液 | yp15-46800ns | 150μL | 0.5mL（棕色盖） | | 盖塔病毒qRT-PCR阳性对照(1×10E7拷贝/μL) | pc46800-MK487997 | 50μL | 0.5mL（黄色盖） | | 使用手册 | 15-46800sc | 1份 | 无 |   本产品使用五孔盒包装 | |
| **运输及保存** | | 低温运输，-20℃保存，保存期限为12个月。 | |
| **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。   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45 μL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的标准曲线样品。放冰上待用。 4. 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的标准曲线样品。放冰上待用。 5. 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DNA的制备**   1. 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。 2. 用自选方法纯化样品的RNA，本试剂盒跟市场上大多数样品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、Probe qRT-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。 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，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** | **PCR阴性对照** | **标准曲线样品管**  **（1-6管）** | | 探针法qRT-PCR缓冲液 | 各10 μL | 10 μL | 各10 μL | | 探针法qRT-PCR酶混合液 | 各2 μL | 2 μL | 各2 μL | | 盖塔病毒qRT-PCR  引物-探针混合液 | 各3 μL | 3 μL | 各3 μL | | N+2个待测RNA样本 | 各5 μL | 不加 | 不加 | | 超纯水 | 不加 | 5 μL | 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（2号样到2号管，3号样到3号管…） |  1. 盖上盖子后上机，按下面参数进行RT-PCR：  |  |  |  | | --- | --- | --- | | **过程** | **温度** | **时间** | | 逆转录 | 50℃ | 15 min | | 预变性 | 95℃ | 10 min | | PCR反应  （45个循环） | 95℃ | 15 sec | | 60℃ | 15 sec（采集FAM通道的荧光信号，设置TAMRA为淬灭基团） |   **四、数据处理**   1. 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DNA浓度的log值，再推算出其浓度。 2. 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必须没有数值，等于或者大于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40。对待测样品，如果其Ct小于40则为阳性。如果没有Ct值，或大于或等于40则为阴性。 | |
| **关联产品** | | 盖塔病毒荧光及可视化RT-LAMP检测试剂盒 | |

20220402fn