

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:15-46800

低温运输，-20℃保存

**BINGENE**

**盖塔病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒**

**Getah 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](http://www.bingene.com); 电话: 400-6005850; 电邮: [order@bingene.com](mailto: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 20 $\mu$ L 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

本产品使用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装材料
探针法 qRT-PCR 缓冲液	990504a	500 $\mu$ L	0.5mL (蓝色盖)
探针法 qRT-PCR 酶混合液	990504b	100 $\mu$ L	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	yp15-46800 ns	150 $\mu$ L	0.5mL (棕色盖)
盖塔病毒 qRT-PCR 阳性对照(1 $\times$ 10E7 拷贝/ $\mu$ L)	pc46800-M K487997	50 $\mu$ L	0.5mL (黄色盖)
使用手册	15-46800sc	1 份	无

## 运输及保存

低温运输, -20 $^{\circ}$ C 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/ $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$   $1 \times 10E7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10E5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  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

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 10 $\mu\text{L}$  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（20 $\mu\text{L}$ 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	PCR 阴性	标准曲线样品管
----	-----	--------	---------

	<b>N+2 个</b>	<b>对照</b>	<b>(1-6 管)</b>
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	各 10 $\mu$ L
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	各 2 $\mu$ L
盖塔病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	各 3 $\mu$ L	3 $\mu$ L	各 3 $\mu$ L
N+2 个待测 RNA 样本	各 5 $\mu$ L	不加	不加
超纯水	不加	5 $\mu$ L	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 5 $\mu$ L (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管...)

11. 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 $^{\circ}$ C	15 min
预变性	95 $^{\circ}$ C	10 min
PCR 反应 (45 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15 sec
	60 $^{\circ}$ C	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

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 DNA 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