

CAT#:15-84000

低温运输，-20℃保存

BINGENE

呼肠孤病毒Ⅲ型探针法 qRT-PCR 试剂盒

Orthoreovirus Ⅲ 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	呼肠孤病毒 3 型(Reo3)为呼肠孤病毒科的正呼肠孤病毒属的代表株,是 RNA 病毒。呼肠孤病毒可以感染多种脊椎动物,包括马、牛、猪、绵羊、豚鼠、犬、猫、貂、禽类、蝙蝠以及人、黑猩猩和猴,除了感染啮齿动物和禽外,一般不引起明显的疾病,特别是对成年动物。鼠类能自然感染 Reo3,其临床表现为黄疸、运动失调、油性被毛、生长发育迟缓等。呼肠孤病毒在人类的某些呼吸道及消化道疾病的发生上,呈现一定的辅助或促进作用,能引起儿童腹泻、呼吸道感染及脑膜炎等疾病。因此检测 Reo3 有重要的意义。本产品就是以探针法 qRT-PCR 技术为基础开发的专门检测呼肠孤病毒Ⅲ型 RNA 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,引物是根据呼肠孤病毒Ⅲ型 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 各数量级。 6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。 7. 本产品只能用于科研。																												
规格及成分	本产品采用五孔盒包装 <table><tr><th>成分</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>探针法 qRT-PCR 缓冲液</td><td>990504a</td><td>500 μL</td><td>0.5mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>探针法 qRT-PCR 酶混合液</td><td>990504b</td><td>100 μL</td><td>0.5mL 红盖管</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>180701</td><td>1 mL</td><td>1.5 mL 绿盖管</td></tr><tr><td>呼肠孤病毒Ⅲ型 qRT-PCR 引物-探针混合液</td><td>yp15-84000ys</td><td>150 μL</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr><tr><td>呼肠孤病毒Ⅲ型 qRT-PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)</td><td>pc15-84000ys</td><td>50 μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>15-84000sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>	成分	编号	规格	包装材料	探针法 qRT-PCR 缓冲液	990504a	500 μL	0.5mL 蓝盖管	探针法 qRT-PCR 酶混合液	990504b	100 μL	0.5mL 红盖管	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管	呼肠孤病毒Ⅲ型 qRT-PCR 引物-探针混合液	yp15-84000ys	150 μL	0.5mL 棕色管	呼肠孤病毒Ⅲ型 qRT-PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	pc15-84000ys	50 μL	0.5mL 黄盖管	使用手册	15-84000sc	1 份	无
成分	编号	规格	包装材料																										
探针法 qRT-PCR 缓冲液	990504a	500 μL	0.5mL 蓝盖管																										
探针法 qRT-PCR 酶混合液	990504b	100 μL	0.5mL 红盖管																										
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管																										
呼肠孤病毒Ⅲ型 qRT-PCR 引物-探针混合液	yp15-84000ys	150 μL	0.5mL 棕色管																										
呼肠孤病毒Ⅲ型 qRT-PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	pc15-84000ys	50 μL	0.5mL 黄盖管																										
使用手册	15-84000sc	1 份	无																										
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 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 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样本制备所要求的起始样本体积一样，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 10 μL	10 μL	各 10 μL													
	探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 μL	2 μL	各 2 μL													
	呼肠孤病毒Ⅲ型 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…)													
	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>15 min</td></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>10 min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (43 个循环)</td><td>95℃</td><td>15 sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>45 sec (采集 FAM 通道的荧光 信号, 淬灭基团为 BHQ1)</td></tr></table>				过程	温度	时间	逆转录	50℃	15 min	预变性	95℃	10 min	PCR 反应 (43 个循环)	95℃	15 sec	60℃	45 sec (采集 FAM 通道的荧光 信号, 淬灭基团为 BHQ1)
过程	温度	时间															
逆转录	50℃	15 min															
预变性	95℃	10 min															
PCR 反应 (43 个循环)	95℃	15 sec															
	60℃	45 sec (采集 FAM 通道的荧光 信号, 淬灭基团为 BHQ1)															
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 必须没有读数, 或者大于或等于 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 40。对待测样品, 如果其 Ct 没有读数、大于或等于 40 则均为阴性, 如果小于 40 则为阳性。																	
关联产品	呼肠孤病毒Ⅲ型探针法 qPCR 检测试剂盒																