

柯萨奇病毒 B 组探针法 PCR 试剂盒
Coxsackie Virus B Probe qPCR Kit

使用手册 V1.0

产品及特点	柯萨奇病毒 (Coxsackie Virus) 是一种肠病毒 (enterovirus), 直径为 28nm, 核酸为单股 RNA。该病毒可在多种组织细胞中增殖, 并引起细胞病变。根据致病特点不同, 柯萨奇病毒分为 A、B 两组。A 组有 23 个血清型, B 组分有 6 个血清型, 柯萨奇病毒 A 型感染儿童多见, 典型症状为疱疹性咽峡炎, 据调查伴有口咽部疱疹和皮疹的急性热病中, 79%为柯萨克 A 组病毒所致。柯萨奇 B 组病毒感染引起特征性传染性胸肋痛病。柯萨奇病毒对人类健康产生了较大威胁, 因此快速灵敏诊断柯萨奇病毒 B 组具有重要意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测柯萨奇病毒 B 组的试剂盒, 它具有下列特点: 1. 即开即用, 用户只需要提供样品 DNA 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. 提供阳性对照和内参, 便于排除假阴性结果。 4. 特异性高, 引物是根据柯萨奇病毒 B 组高度保守区设计, 不会跟其他生物的 DNA 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 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 <table><tr><th>成分</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>2×Probe PCR MagicMix</td><td>981201</td><td>0.5 mL</td><td>0.5mL 本色管</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>柯萨奇病毒 B 组 PCR 引物-探针混合液 (含内参探针)</td><td>yp17-17238</td><td>200 μL</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr><tr><td>柯萨奇病毒 B 组 PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)</td><td>Pc17-17238</td><td>50 μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>柯萨奇病毒 B 组 PCR 内参 (1×10E4 拷贝/μL)</td><td>Icpd17-17238</td><td>250 μL</td><td>0.5mL 白盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>17-17238sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>	成分	编号	规格	包装材料	2×Probe PCR MagicMix	981201	0.5 mL	0.5mL 本色管	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管	柯萨奇病毒 B 组 PCR 引物-探针混合液 (含内参探针)	yp17-17238	200 μL	0.5mL 棕色管	柯萨奇病毒 B 组 PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	Pc17-17238	50 μL	0.5mL 黄盖管	柯萨奇病毒 B 组 PCR 内参 (1×10E4 拷贝/μL)	Icpd17-17238	250 μL	0.5mL 白盖管	使用手册	17-17238sc	1 份	无
成分	编号	规格	包装材料																										
2×Probe PCR MagicMix	981201	0.5 mL	0.5mL 本色管																										
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管																										
柯萨奇病毒 B 组 PCR 引物-探针混合液 (含内参探针)	yp17-17238	200 μL	0.5mL 棕色管																										
柯萨奇病毒 B 组 PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	Pc17-17238	50 μL	0.5mL 黄盖管																										
柯萨奇病毒 B 组 PCR 内参 (1×10E4 拷贝/μL)	Icpd17-17238	250 μL	0.5mL 白盖管																										
使用手册	17-17238sc	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 DNA。																												
使用方法	一、稀释含内参的标准曲线样品 (以阳性对照 10E1-10E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度和内参固定在 10E3 拷贝/μL 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)。 1. 标记 6 个离心管, 分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0。																												

2. 在 0 号管中加入 280μL 荧光 PCR 专用模板稀释液, 35μL 本试剂盒提供的内参, 震荡一分钟混匀。
3. 用带芯枪头分别将上步得到的混合液按 45μL/管加入到标记的 1-6 号管中, 最好用带芯枪头(下同)。
4. 在 6 号管中加入 5 μL 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 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 5 号管中加入 5 μL 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 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 换枪头, 在 4 号管中加入 5 μL 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 的标准曲线样品。放冰上待用。
7. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线阳性样品, 每个样品中内参的浓度固定为 10^3 拷贝/μL。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

8. 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。最后在所有样本中加入 5uL 本试剂盒提供的内参(共 50000 拷贝)。
9. 用自选方法纯化样品的 DNA (含内参), 本试剂盒跟市场上大多数 DNA 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 qPCR 反应 (20μL 体系, 在样品制备室进行)

10. 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(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。
11. 在标记管中按下表加入各成分(本表只列出一次重复):

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性 对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
2×Probe qPCR MagicMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
柯萨奇病毒 B 组 PCR 引物-探针混合液(含内参引物)	各 4 μL	4 μL	各 4 μL

	N+2 个待测 DNA（含内参）	各 6 μL	不加	不加													
	超纯水	不加	6 μL	不加													
	第 6 步所得标准曲线样品稀释液（含内参，1-6 号）	不加	不加	各 6μL（2 号样到 2 号管，3 号样到 3 号管…）													
	12. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR:																
	<table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>3 min</td></tr><tr><td rowspan="3">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>95℃</td><td>10 sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60 sec</td></tr><tr><td>72℃</td><td>60 sec（采集 FAM 通道和 Hex 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）</td></tr></table>	过程	温度	时间	预变性	95℃	3 min	PCR 反应 (45 个循环)	95℃	10 sec	60℃	60 sec	72℃	60 sec（采集 FAM 通道和 Hex 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）			
过程	温度	时间															
预变性	95℃	3 min															
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	10 sec															
	60℃	60 sec															
	72℃	60 sec（采集 FAM 通道和 Hex 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）															
四、数据处理																	
13. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系，购买新的引物和探针。对任何阴性样品，如果内参无 Ct，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。																	
14. 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，分别以阳性对照（FAM 通道）和内参（HEX 通道）的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照的标准曲线为斜线，r2 必须大于 0.95，内参的标准曲线为一条跟 X 轴平行的横线。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照的标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。																	
15. 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 FAM 通道的 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照 FAM 通道的荧光信号必须有对数增长，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。对任何 FAM 通道结果为阴性的样品，如果其对应的内参 HEX 通道无 Ct，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。																	
关联产品	柯萨奇病毒 B 组荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒																