

鸠宁病毒染料法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

咨询 QQ : [2881498726](https://www.qq.com)

订购热线 : [021 - 54720761](tel:021-54720761)

咨询电话 : [13166274233\(微信同号\)](https://www.wechat.com)

产品及特点:

鸠宁病毒(Junin Virus,JUNV)是一种 RNA 病毒, 会引发阿根廷出血热, 临床特征有发热、剧烈肌痛、出血、休克、神经异常及白细胞和血小板减少等。70%~80%患者上述症状和体征减轻, 但乏力、脱发及记忆力减退需经 1~3 个月恢复期, 不留后遗症。20%~30%患者在 8~12 病日出现胃、肠、鼻、齿龈、子宫等严重出血或神经系统损害(意识障碍、共济失调、兴奋和震颤, 甚至谵妄、抽搐、昏迷), 也可同时出现, 导致死亡, 给人体健康带来较大的风险, 因此鸠宁病毒的快速准确鉴定对该病的预防和检疫有着重要作用。本产品基于 PCR 原理开发。

1. 一站式, 用于不需要单独准备每种成分, 包括引物和对照。
2. 根据鸠宁病毒的保守基因序列设计的引物, 具有良好的特异性。
3. 基于染料法 qRT-PCR 检测, 灵敏度比常规 RT-PCR 高 10-100 倍, 可以达到至少 1000 拷贝/反应。
4. 使用一管式 qRT-PCR 技术, RT 和 PCR 两步在一个试管内完成, 不需要中间转移样品, 降低了操作误差和可能的污染。
5. 本产品足够 50 次 30 μ L 体系的 RT-PCR。

规格及成分:

| 编号 | 成分 | 规格 |
|-----|-------------------------------------|----------------|
| 试剂一 | 2×qRT-PCR 缓冲液 | 500 μL (棕色管) |
| 试剂二 | 10×qRT-PCR 酶混合液 | 100 μL (红盖) |
| 试剂三 | ROX 染料 I, 50× | 20 μL (棕色管) |
| 试剂四 | ROX 染料 II, 50× | 20 μL (棕色管) |
| 试剂五 | 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 1mL (黄盖) |
| 试剂六 | 鸠宁病毒染料法 qRT-PCR 引物混合液 | 100 μL (白盖) |
| 试剂七 | 鸠宁病毒染料法 qRT-PCR 阳性对照 (1×10E8 拷贝/μL) | 50 μL (黄盖) |
| 试剂八 | 沙核酸释放剂 (试用装) | 20 次 (1mL, 绿盖) |
| 试剂九 | 使用手册 | 1 份 |

运输及保存:

低温运输、-20℃保存, 有效期一年。

阳性对照需要因易污染其他成分需要单独放置。本产品不提供活体样品做阳性对照, 只提供 DNA 片段作为阳性对照。

自备试剂:

样品 RNA

使用方法:

一、稀释阳性对照:

以 10E2-10E7 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。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原。

1. 标记 6 个离心管, 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 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)。
2. 在 7 号管中加入 5 μL 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照(本试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。

3. 换枪头, 在 6 号管中加入 5 μL 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。

4. 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 的阳性对照。放冰上待用。重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备:

5. 如果有 N 个样品, 必须设置 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 μL 上步制备的阳性对照梯度稀释液中的第 4 号 (浓度为 1×10^4 拷贝/ μL , 10 μL 相当于 1 万拷贝) 再加上一定量的水作为制备的阳性对照 (加水后其总体积跟样品一样, 样品体积多少取决于所用试剂盒的要求)。可以用水作为制备的阴性对照。

6. 用自选方法纯化 N+2 个样品的 RNA, 本试剂盒跟市场上大多数病毒 RNA 提取试剂盒兼容。

三、设置 RT-PCR 反应 (20 μL 体系, 在样品制备室进行) :

7. 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, 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 (用第 4 号阳性对照稀释液做模板)。下面只描述定量分析的步骤, 定性分析只是把 6 个标曲反应缩减成 1 个, 其余不变。

8. 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, 阳性对照样品要等所有管子盖上盖子后最后加) :

| 成分 | N+2 个制备所得样品 | qRT-PCR 阴性对照 | qRT-PCR 阳性对照 (2-7 管) |
|-------------------------|-------------|--------------|-------------------------------------|
| 2×qRT-PCR 缓冲液 | 10μL | 10 μL | 各 10 μL |
| 鸠宁病毒染料法 qRT-PCR 引物混合物 | 2 μL | 2 μL | 各 2 μL |
| 50×ROX (见注) | 0.4μL | 0.4μL | 各 0.4μL |
| 样品制备所得 RNA 模板 (来于第 8 步) | 5.6μL | -- | -- |
| 稀释所得 6 个阳性对照 (来于第 6 步) | -- | -- | 各 5.6μL (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管...) |
| 超纯水 | -- | 5.6μL | -- |
| 10×qRT-PCR 酶混合液 | 2μL | 2μL | 2μL |

注: 需使用 ROX 染料 I 的机型: ABI Prism7000、7300、7700、7900HT、

Step-One、Step-One Plus。

需使用 ROX 染料 II 的机型: : ABI Prism 7500、7500Fast、MJ Research 的

Chromo4、Opticon (II) Corbett Rotor Gene 3000。

不需要使用 ROX 的机型: Thermal Cycle Dice Real Time System, LightCycler、Smart Cycler System、Agilent Mx3000P、RotorGene3000、RotorGene 6000。

9. 上机后按下面参数进行 RT-PCR (参数可能会因仪器不同而需优化)。

| 过程 | 温度 | 时间 |
|---------------------|------|-------------------------|
| RT (逆转录) | 50°C | 15-30 min |
| 预变性 | 95°C | 5 min |
| Qrt-PCR 反应 (40 个循环) | 95°C | 15 sec |
| | 58°C | 1 min, (采集 FAM 通道的荧光信号) |
| 按仪器预设程序进行溶解曲线分析 | | |

四、数据处理:

10. 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。

11. 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 30。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。

所有产品仅供科研使用, 不得用于其他用途。