

天恩泽系列

CAT#:15-64800

低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

登革病毒通用探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

Dengue Virus(DENV) Probe qRT-PCR Kit

使用手册 V1.1

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区西二旗智学苑配套商业用房 B 座二层 212 室

网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>登革病毒(Dengue Virus , DEN)是经白纹伊蚊及埃及伊蚊传播的披膜病毒科黄病毒属病毒家族的成员,血清学上根据 E 蛋白抗原性不同分为 I 、 II 、 III 、 IV型。DEN 感染人类不仅可引起登革热(Dengue fever , DF),还可引起登革出血热(Denguehemorrhagic fever , DHF) 和登革休克综合症(Dengue shock syndrome,DSS),可导致 30%~ 40%的患者死亡。据估计全世界每年登革热发病人数约 6 千万,受威胁人口约 25 亿,已成为世界上分布广、发病率高、危害较大的一种虫媒病毒性疾病,成为全球性重要公共卫生问题。登革热病毒主要流行于热带及亚热带地区,近年来我国东南沿海地区尤以广东多次发生登革热流行。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登革病毒通用型的试剂盒,它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 即开即用,用户只需要提供样品 RNA 模板。</li> <li>2. 引物和探针经过优化,分析灵敏性高。</li> <li>3. 提供阳性对照,便于区分假阴性样品。</li> <li>4. 特异性高,引物是根据登革病毒通用高度保守区设计,不会跟其他病毒的 RNA 发生交叉反应。</li> <li>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。</li> <li>6. 本产品足够 50 次 20<math>\mu</math>L 体系的探针法荧光定量 RT-PCR 反应。</li> <li>7. 本产品只能用于科研。</li> </ol>																
<p><b>规格及成分</b></p>	<table border="1" data-bbox="596 1335 1294 1816"> <thead> <tr> <th data-bbox="596 1335 1067 1391">成分</th> <th data-bbox="1067 1335 1294 1391">编号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="596 1391 1067 1453">A</td> <td data-bbox="1067 1391 1294 1453">190504a</td> </tr> <tr> <td data-bbox="596 1453 1067 1516">B</td> <td data-bbox="1067 1453 1294 1516">190504b</td> </tr> <tr> <td data-bbox="596 1516 1067 1579">C</td> <td data-bbox="1067 1516 1294 1579">180701</td> </tr> <tr> <td data-bbox="596 1579 1067 1641">D</td> <td data-bbox="1067 1579 1294 1641">15-64800yp</td> </tr> <tr> <td data-bbox="596 1641 1067 1704">E</td> <td data-bbox="1067 1641 1294 1704">64800pc</td> </tr> <tr> <td data-bbox="596 1704 1067 1816">使用手册</td> <td data-bbox="1067 1704 1294 1816">15-64800sc</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	A	190504a	B	190504b	C	180701	D	15-64800yp	E	64800pc	使用手册	15-64800sc
成分	编号																
A	190504a																
B	190504b																
C	180701																
D	15-64800yp																
E	64800pc																
使用手册	15-64800sc																
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输, -20<math>^{\circ}</math>C保存, 保存期限为 12 个月。</p>																
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>样品 RNA, 超纯水。</p>																

## 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 RT-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 RNA 的制备

7. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的是 PC (样品制备阳性对照) 和 NC (样品制备阴性对照)。可以取阳性对照的 1000 倍稀释液 10 $\mu\text{L}$  再加上一定量的水，使总体积与待提取样品的规定体积一致，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病毒 RNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的柱式病毒 RNAout 或免提取核酸释放剂。

### 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(用第 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/每管	样品管 N+2 个	RT-PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
A	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
B	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
D	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L
N+2 个待测 RNA 样本	5 $\mu$ L	不加	不加
自备超纯水	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	5 $\mu$ L (1 号样到 1 号管,2 号样到 2 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	20 min
预变性	95 $^{\circ}$ C	10 min
RT-PCR 反应 (45 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15 sec
	57 $^{\circ}$ C	30 sec
	72 $^{\circ}$ C	30 sec (采集 FAM 通道的荧光信号)

### 五、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 36。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 36 则为阳性。如果在 36-40 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。

### 关联产品

登革病毒通用染料法荧光定量 RT-PCR 试剂盒