森林脑炎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

订购热线 ： 021 - 54720761

咨询电话 ： 13166274223(微信同号)

产品及特点:

森林脑炎病毒(Forest Encephalitis Virus，SFV)是一种 RNA 病毒，由蜱传播，在春夏季节流行于俄罗斯及我国东北森林地带，非疫区易感人被带有病毒的蜱叮咬后，易感染发病，另外因喝生羊奶（羊感染时奶中有病毒或被蜱类污染）而被传染，约经 8～14 天潜伏期后发生脑炎，出现肌肉麻痹、萎缩、昏迷致死，少数痊愈者也常遗留肌肉麻痹。居住在森林疫区的发生脑炎，出现肌肉麻痹、萎缩、昏迷致死，少数痊愈者也常遗留肌肉麻痹。居住在森林疫区的人，因受少量病毒的隐性感染，血中有中和抗体，对病毒有免疫力，因此森林脑炎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. 根据森林脑炎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 30μL 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	森林脑炎病毒染料法 qRT-PCR 引物混合液	100 μL（白盖）
试剂七	森林脑炎病毒染料法 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 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 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 1×10E6 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 10μL 上步制备的阳性对照梯度稀释液中的第 4 号（浓度为 1×10E4 拷贝/μL，10μL 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
森林脑炎病毒染料法	2 μL	2 μL	各 2 μL

qRT-PCR 引物混合物			
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℃	15-30 min
预变性	95℃	5 min
Qrt-PCR 反应（40 个循环）	95℃	15 sec
	58℃	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。