

柯萨奇病毒 A6 型/A10 型/A16 型/肠道病毒/

肠道病毒 71 型双管五重探针法 qRT-PCR 试剂盒

Skygen CV A6/CV A10/CV A16/EV71/EV Probe Quintuplex qPCR Kit

(Without Internal Control)

目录号: ml107669

使 用 说 明 书

产品及特点

柯萨奇病毒 A 组(Coxsackievirus A Group, CVA)属于小 RNA 病毒科肠道病毒属,为正义单链 RNA 病毒,基因组全长约为 7400 nt。柯萨奇病毒 A 组有 24 个血清型,其中, A6 型, A10 型和 A16 型的柯萨奇病毒已经成为手足口病重要病原体。肠道病毒 (Enterovirus) 是一类单股正链 RNA 病毒,基因组 7200 bp 到 8500 bp 左右,属于小颗粒病毒科。它们主要感染人类,引发手足口病、脊髓灰质炎和心肌炎等,给人类的健康造成了极大危害。肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, EV71) 是基因组约为 7400 bp 的单股正链 RNA 病毒,是引起手足口病的重要病原体之一。还能引起无菌性脑膜炎、脑干脑炎和脊髓灰质炎样的麻痹等多种与神经系统相关的疾病。上述病毒给人类的健康造成极大的危害。因此对其快速检测具有重要意义。本产品就是以探针法 qRT-PCR 技术为基础开

发的相关试剂盒，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，分析灵敏度高，可以达到 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于排除假阴性结果。
4. 特异性高，引物和探针分别根据柯萨奇病毒 RNA A6 型、A10 型和 A16 型，肠道病毒 71 型和肠道病毒 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，但不推荐用于定量。
6. 两管五重设计，一管反应用于检测柯萨奇病毒 A6 /A10 /A16 型，一管用于检测肠道病毒和肠道病毒 71 型。
7. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的两管五重探针法 RT-PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	规格	包装
探针法 RT-PCR 缓冲液	500 $\mu\text{L} \times 2$	0.5 mL 蓝盖管
探针法 RT-PCR 酶混合液 v2	100 $\mu\text{L} \times 2$	0.5 mL 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1 mL	1.5 mL 绿盖管
柯萨奇病毒 A6 型/A10 型/A16 型三重 RT-PCR 引物- 探针干粉	50 次	0.5 mL 棕色管
柯萨奇病毒 A10 型阳性对照 (1E4 拷贝/ μL)	50 次	0.5 mL 棕色管
柯萨奇病毒 A10 型阳性对照 (1E4 拷贝/ μL)	50 次	0.5 mL 棕色管
柯萨奇病毒 A16 型阳性对照 (1E4 拷贝/ μL)	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	1 份	无
第一部分, 编号 15-15575-5-pt1, 10 孔盒包装		
成分	规格	包装
肠道病毒和肠道病毒 71 型 RT-PCR 引物-探针干粉	50 次	0.5 mL 棕色管
肠道病毒 71 型阳性对照 (1E4 拷贝/ μL)	50 μL	0.5 mL 黄盖管
肠道病毒阳性对照 (1E4 拷贝/ μL)	50 μL	0.5 mL 白盖管
使用手册	1 份	1 份
第二部分, 编号 15-15575-5-pt2, 5 孔盒包装		
注 意: 引物-探针干粉在使用前需要短暂离心, 然后在离心管中加入 165 mL 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20℃保存。		

使用方法

一、样品 RNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，设置 N+6 个提取，多出的一个是提取阴性对照，样本为不含有要检测的 5 种病毒的样本。多出的另外 5 个是分别含有 5 种病毒之一的提取阳性对照。
2. 用自选方法纯化样品的 RNA（含内参），本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容。

二、设置两管 5 重探针法 RT-PCR 反应 (20 μ L 体系)

3. 对上步提取得到的 N+6 个核酸样本，设置 (N+6) +6 个 RT-PCR 反应，多出的 6 个中 1 个是 RT-PCR 阴性对照，另外 5 个分别是 5 种病毒的扩增阳性对照。
4. 在第 1 组 PCR 管中按下表加入各成分检测柯萨奇病毒 A6 型/A10 型/A16 型：

成分	样品管 N+6 个	RT-PCR 阴 性对照	A6 型 PC	A10 型 PC	A16 型 PC
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
柯萨奇病毒 A6 型/A10 型/A16 型三重 RT-PCR 引物-探针混合液	各 3 μ L	3 μ L	3 μ L	3 μ L	3 μ L
N+6 个待测 RNA	各 5 μ L	不加	不加	不加	不加
超纯水	不加	5 μ L	不加	不加	不加
柯萨奇病毒 A6 型阳性对照 (1E4 拷贝/ μ L)	不加	不加	5 μ L	不加	不加
柯萨奇病毒 A10 型阳性对照 (1E4 拷贝/ μ L)	不加	不加	不加	5 μ L	不加
柯萨奇病毒 A16 型阳性对照 (1E4 拷贝/ μ L)	不加	不加	不加	不加	5 μ L

5. 在第 2 组 PCR 管中按下表加入各成分检测肠道病毒和肠道病毒 71 型：

成分	样品管 N+2 个	RT-PCR 阴性 对照	肠道病毒 PC	肠道病毒 71 型 PC
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
肠道病毒和肠道病毒 71 型 RT-PCR 引物-探针混合液	各 3 μ L	3 μ L	3 μ L	3 μ L
N+2 个待测 RNA	各 5 μ L	不加	不加	不加
超纯水	不加	5 μ L	不加	不加
肠道病毒阳性对照 (1E4 拷贝/ μ L)	不加	不加	5 μ L	不加
肠道病毒 71 型阳性对照 (1E4 拷贝/ μ L)	不加	不加	不加	5 μ L

6. 将上述两组 PCR 管盖上盖子后上机，按下面参数进行 RT-PCR：

过程	温度	时间
逆转录	50°C	10 min
预变性	95°C	5 min
RT-PCR 反应 (40 个循环)	95°C	15 sec
	62°C	60 sec (对第一组，采集 FAM 通道、HEX 通道和 Cy5 通道 三个通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA。 对第二组，采集 FAM 通道和 Cy5 通道两个通道的荧 光信号，淬灭基团均为 TAMRA)

三、数据处理

7. 荧光通道分配表

	成分	荧光通道
第一组	柯萨奇病毒 A6	FAM
	柯萨奇病毒 A10	HEX
	柯萨奇病毒 A16	Cy5
第一组	肠道病毒	FAM
	肠道病毒 71 型	Cy5

8. 5 个扩增阳性对照或 5 个样本制备阳性对照中的任何一个结果为阴性（即在其所对应的荧光通道的 Ct 大于 40 或没有 Ct 值），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。如果任何一个扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性（上表中所用荧光通道任何一个为阳性均算），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。

9. 如果阴性对照和阳性对照正常，则实验有效，可以进入后续分析。

10. 对第 1 组样本，如果 FAM 通道的 Ct 大于或等于 40 则为柯萨奇病毒 A6 阴性，如果小于或等于 40 则为阳性。如果 HEX 通道的 Ct 大于或等于 40 则为柯萨奇病毒 A10 阴性，如果小于或等于 40 则为阳性。如果 Cy5 通道的 Ct 大于或等于 40 则为柯萨奇病毒 A16 阴性，如果小于或等于 40 则为阳性。

11. 对第 2 组样本，如果 FAM 通道的 Ct 大于或等于 40 则为肠道病毒阴性，如果小于或等于 40 则为阳性。如果 Cy5 通道的 Ct 大于或等于 40 则为肠道病毒 71 型阴性，如果小于或等于 40 则为阳性。

自备试剂

样品 RNA，超纯水

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。