天净沙系列

CAT#:15-17206-17210

低温运输，-20℃保存

天净沙

柯萨奇病毒 A6/A10 型双重探针法 RT-PCR 试剂盒

Coxsackievirus A6/A10 Probe RT-PCR Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

柯萨奇病毒(Coxsakie Virus，CoxV)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。它可以被划分为 A 组和 B 组，柯萨奇病毒 A 组有 24 个血清型，其中柯萨奇病毒 A6 和 A10 主要通过粪-口传播的方式传染给其他人，但也可经口对口的传染方式染病，人类感染柯萨奇病毒易引起疱疹性咽峡炎和非麻痹性类脊髓灰质炎等症状。这两种血清型对人的健康生活造成巨大危害，因此快速检测与分型柯萨奇病毒 A6/A10 具有重要的意义。本产品就是以探针法qRT-PCR技术为基础开发的专门检测与分型柯萨奇病毒A6型和柯萨奇病毒A10型的试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品 RNA 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/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 A6 型和柯萨奇病毒 A10 型 RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
5. 可用于定性检测，不推荐用于定量检测。
6. 两个探针分别用 FAM 和 HEX 标记，检测和分型同时完成。
7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 RT-PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用十孔盒包装

成分	编号	规格	包装材料
探针法 qRT-PCR 缓冲液	990504a	500 μL	0.5mL 蓝盖管
探针法 qRT-PCR 酶混合液	990504b	100 μL	0.5mL 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
柯萨奇病毒 A6/A10 型 RT-PCR 引物-探针干粉(含内参探针)	yp17-17206-17210	50 次	0.5mL 棕色管
柯萨奇病毒 A6 型阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	pc15-17206	50 次	0.5mL 黄盖管
柯萨奇病毒 A10 型阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	pc17-17210	50 次	0.5mL 白盖管
使用手册	17-17206-17210sc	1 份	无

注意：引物-探针干粉(含内参探针)在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 220 μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存

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 RNA。

使用方法

一、样品 RNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，最好设置 N+3 个提取，多出的一个是柯萨奇病毒 A6 型的 PC（样品制备阳性对照），多出的一个是柯萨奇病毒 A10 型的 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用自备的、确定是阳性的样本作为样品制备阳性对照，可以用自备的、确定是阴性的样本作为样品制备阴性对照，可以用水替代。
2. 用自选方法纯化样品的 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 RNA 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 qRT-PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

3. 如果有 N+3 个核酸提取，则设置 N+6 个 RT-PCR 反应，多出的 3 个 1 个是 RT-PCR 阴性对照，另外两个分别柯萨奇病毒 A6 型和柯萨奇病毒 A10 型阳性对照。
4. 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+3 个	RT-PCR 阴性对照	柯萨奇病毒 A6 型 PC	柯萨奇病毒 A10 型 PC
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
柯萨奇病毒 A6 型- 柯萨奇病毒 A10 型 RT-PCR 引物-探针混合液	各 4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
N+3 个待测 RNA	各 4 μL	不加	不加	不加
超纯水	不加	4 μL	不加	不加
柯萨奇病毒 A6 型阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	不加	不加	4 μL	不加
柯萨奇病毒 A10 型阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	4 μL

5. 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℃	15 min
预变性	95℃	10 min
RT-PCR 反应 (45 个循环)	94℃	30 sec
	X℃	X sec
	60℃	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

	6. 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。 7. 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。 8. 对定性检测，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 40。对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 大于或等于 40 则为柯萨奇病毒 A6 型阴性，如果小于或等于 40 则为柯萨奇病毒 A6 型阳性。如果其 HEX 通道的 Ct 大于或等于 40 则为柯萨奇病毒 A10 型阴性，如果小于或等于 40 则为柯萨奇病毒 A10 型阳性。
关联产品	柯萨奇病毒 A6 型荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒