

# 诺如病毒 G1 型探针法 qRT-PCR 试剂盒

## Norwalk Viruses G1 Probe qRT-PCR Kit

目录号: [ml104283](#)

# 使 用 说 明 书

### 产品及特点

诺如病毒 (Norwalk Virus) 是单股正链 RNA 病毒, 属于人类杯状病毒属, 是一种引起非细菌性急性肠胃炎的病毒, 如诺病毒感染性强, 以肠道传播为主, 通过口-粪传播, 以污染的水源、食物、贝类、物品、空气作为主要传播载体。诺如病毒可分为 G I-G V 五个基因群, 其中引起人类感染的主要是 G I、G II 和 G IV 型。因此快速灵敏诊断具有重要意义。本产品以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测诺如病毒 G I 型的试剂盒,

#### 它有下列特点:

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, 便于区分假阴性样品。

|                                                                            | <p>4. 特异性高, 引物是根据诺如病毒 G1 型 RNA 高度保守区设计, 不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。</p> <p>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 各数量级。</p> <p>6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。</p> <p>7. 本产品只能用于科研。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |           |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                           |      |           |                                      |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                            |  |  |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|----|----|-----------------|-------|-----------|---------------------|------|-----------|----------------|-----|-----------|---------------------------|------|-----------|--------------------------------------|------|-----------|------|-----|---|------------|--|--|----------------------------------------------------------------------------|--|--|
| 规格及成分                                                                      | <table><tr><th>成分</th><th>规格</th><th>包装</th></tr><tr><td>探针法 qRT-PCR 缓冲液</td><td>500μL</td><td>0.5mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2</td><td>50μL</td><td>0.5mL 红盖管</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>1mL</td><td>1.5mL 绿盖管</td></tr><tr><td>诺如病毒 G1 型 qRT-PCR 引物-探针干粉</td><td>50 次</td><td>1.5mL 棕色管</td></tr><tr><td>诺如病毒 G1 型 qRT-PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)</td><td>50μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>1 份</td><td>无</td></tr><tr><td colspan="3">本产品采用五孔盒包装</td></tr><tr><td colspan="3"><b>注 意:</b> 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 162uL 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20℃保存。</td></tr></table> | 成分        | 规格 | 包装 | 探针法 qRT-PCR 缓冲液 | 500μL | 0.5mL 蓝盖管 | 探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2 | 50μL | 0.5mL 红盖管 | 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 1mL | 1.5mL 绿盖管 | 诺如病毒 G1 型 qRT-PCR 引物-探针干粉 | 50 次 | 1.5mL 棕色管 | 诺如病毒 G1 型 qRT-PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL) | 50μL | 0.5mL 黄盖管 | 使用手册 | 1 份 | 无 | 本产品采用五孔盒包装 |  |  | <b>注 意:</b> 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 162uL 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20℃保存。 |  |  |
| 成分                                                                         | 规格                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 包装        |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                           |      |           |                                      |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                            |  |  |
| 探针法 qRT-PCR 缓冲液                                                            | 500μL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 0.5mL 蓝盖管 |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                           |      |           |                                      |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                            |  |  |
| 探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2                                                        | 50μL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 0.5mL 红盖管 |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                           |      |           |                                      |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                            |  |  |
| 荧光 PCR 专用模板稀释液                                                             | 1mL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 1.5mL 绿盖管 |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                           |      |           |                                      |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                            |  |  |
| 诺如病毒 G1 型 qRT-PCR 引物-探针干粉                                                  | 50 次                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1.5mL 棕色管 |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                           |      |           |                                      |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                            |  |  |
| 诺如病毒 G1 型 qRT-PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)                                       | 50μL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 0.5mL 黄盖管 |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                           |      |           |                                      |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                            |  |  |
| 使用手册                                                                       | 1 份                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 无         |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                           |      |           |                                      |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                            |  |  |
| 本产品采用五孔盒包装                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |           |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                           |      |           |                                      |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                            |  |  |
| <b>注 意:</b> 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 162uL 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                                                                       | <p><b>一、稀释标准曲线样品</b> (以 10E1-10E6 拷贝/μL 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。如果需要 RNA 阳性样品, 需要另外订购。</p> <p>1. 标记 6 个离心管, 分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。</p> <p>2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液, 用带芯枪头, 下同。</p> <p>3. 在 6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10E6</p>                                                                                                                                                                                                                                             |           |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                           |      |           |                                      |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                            |  |  |

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  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^5$  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  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^4$  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, 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 $\mu\text{L}$  上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次样本制备所要求的起始样本体积一样, 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 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 $\mu\text{L}$ 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 (直接用第 6 步第 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加) :

| 成分              | 样品管 N+2 个          | RT-PCR 阴性对照      | 标曲样品管 (1-6 管)      |
|-----------------|--------------------|------------------|--------------------|
| 探针法 qRT-PCR 缓冲液 | 各 10 $\mu\text{L}$ | 10 $\mu\text{L}$ | 各 10 $\mu\text{L}$ |

|                                                                                                                                        | 探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 各 1μL                             | 1μL   | 各 1μL |    |    |    |     |     |       |     |     |      |                           |     |       |     |                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|----|----|----|-----|-----|-------|-----|-----|------|---------------------------|-----|-------|-----|-----------------------------------|
|                                                                                                                                        | 诺如病毒 G1 型 qRT-PCR 引物-探针混合液                                                                                                                                                                                                                                                                               | 各 3μL                             | 3μL   | 各 3μL |    |    |    |     |     |       |     |     |      |                           |     |       |     |                                   |
|                                                                                                                                        | N+2 个待测 RNA 样本                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 各 6μL                             | 不加    | 不加    |    |    |    |     |     |       |     |     |      |                           |     |       |     |                                   |
|                                                                                                                                        | 超纯水                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 不加                                | 6μL   | 不加    |    |    |    |     |     |       |     |     |      |                           |     |       |     |                                   |
|                                                                                                                                        | 第 6 步所得标准曲线样品稀释液（1-6 号）                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 不加                                | 不加    | 各 6μL |    |    |    |     |     |       |     |     |      |                           |     |       |     |                                   |
|                                                                                                                                        | 11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 RT-PCR：                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                   |       |       |    |    |    |     |     |       |     |     |      |                           |     |       |     |                                   |
|                                                                                                                                        | <table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>逆转录</td><td>50℃</td><td>10min</td></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>5min</td></tr><tr><td rowspan="2">RT-PCR 反应<br/><br/>(40 个循环)</td><td>95℃</td><td>15sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60sec（采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA）</td></tr></table> |                                   |       |       | 过程 | 温度 | 时间 | 逆转录 | 50℃ | 10min | 预变性 | 95℃ | 5min | RT-PCR 反应<br><br>(40 个循环) | 95℃ | 15sec | 60℃ | 60sec（采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA） |
|                                                                                                                                        | 过程                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 温度                                | 时间    |       |    |    |    |     |     |       |     |     |      |                           |     |       |     |                                   |
|                                                                                                                                        | 逆转录                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 50℃                               | 10min |       |    |    |    |     |     |       |     |     |      |                           |     |       |     |                                   |
|                                                                                                                                        | 预变性                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 95℃                               | 5min  |       |    |    |    |     |     |       |     |     |      |                           |     |       |     |                                   |
| RT-PCR 反应<br><br>(40 个循环)                                                                                                              | 95℃                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 15sec                             |       |       |    |    |    |     |     |       |     |     |      |                           |     |       |     |                                   |
|                                                                                                                                        | 60℃                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 60sec（采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA） |       |       |    |    |    |     |     |       |     |     |      |                           |     |       |     |                                   |
| 四、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 必须没有读数，或者大于或等于 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 40。对待测样品，如果其 Ct 没有读数、大于或等于 40 则均为阴性，如果小于 40 则为阳性。 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                   |       |       |    |    |    |     |     |       |     |     |      |                           |     |       |     |                                   |
| 自备试剂                                                                                                                                   | 样品 RNA。                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                   |       |       |    |    |    |     |     |       |     |     |      |                           |     |       |     |                                   |
| 运输及保存                                                                                                                                  | 低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                   |       |       |    |    |    |     |     |       |     |     |      |                           |     |       |     |                                   |