

TaKaRa Code: D327

**TaKaRa HFMD Virus
Detection Kit
(60 次量)**

说明书

TaKaRa

宝生物工程(大连)有限公司

目 录

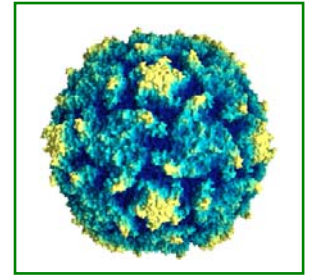
内 容	页 码
●制品说明	1
●制品内容	1
●保 存	1
●扩增片段大小	1
●原 理	2
●RNA 样品制备	2
●注意事项	2
●实验操作	3
●结果判定	4

● 制品说明

自 1959 年由人类肠道病毒 (enterovirus, EV) 导致手足口病 (hand, foot and mouth disease, HFMD) 报道以来, HFMD 已经在全球多次爆发。HFMD 常由多种 EV 共同引起, 而肠道病毒 71 型 (EV71) 和肠道病毒柯萨奇 A16 (Coxsackie A16, CA16) 往往是手足口病暴发流行的最主要病原。

本制品是快速、特异性检出人类肠道病毒通用型EV、特异型EV71 和特异型CA16 病毒的One Step RT-PCR试剂盒。反转录反应使用了TaKaRa公司独自开发的新型反转录酶PrimeScript™ Rtase, 将病毒RNA反转录为cDNA后, 使用Hot Start DNA聚合酶*TaKaRa Ex Taq* HS扩增cDNA, 达到对人类肠道病毒通用型EV、特异型EV71 和特异型CA16 病毒进行简单快速的定性检测的目的。试剂盒中附加了内参照DNA (Internal Control

DNA), 用以监控反应是否正常进行, 防止假阴性结果的产生。制品中的DNA聚合酶使用了Hot Start法用DNA聚合酶*TaKaRa Ex Taq* HS, 可以有效抑制非特异性PCR扩增, 大大提高了PCR检测灵敏度。本试剂盒可以检测到少至 10^2 Copies的人类肠道病毒通用型EV、特异型EV71 及特异型CA16 RNA。实验证明, 本试剂盒检测性能良好, 准确率高, 具有广泛的应用价值。



人类肠道病毒 (EV) 图

● 制品内容 (25 μ l \times 60 次量, 其中 EV \times 20 次量, EV71 \times 20 次量, CA16 \times 20 次量)

PrimeScript One Step Enzyme Mix*1	120 μ l
2 \times One Step Buffer*2	750 μ l \times 2 支
EV Universal Primer Mixture*3 (各 15 μ M)	20 μ l
EV71 Primer Mixture*3 (各 10 μ M)	20 μ l
CA16 Primer Mixture*3 (各 10 μ M)	20 μ l
RNase Free dH ₂ O	750 μ l \times 2 支
Control RNA for EV Universal (5×10^7 Copies/ μ l)	20 μ l
Control RNA for EV71 (5×10^7 Copies/ μ l)	20 μ l
Control RNA for CA16 (5×10^7 Copies/ μ l)	20 μ l

*1 内含 RTase, Inhibitor, *TaKaRa Ex Taq* HS 等。

*2 内含 dNTP Mixture 等。

*3 内含 Internal Control DNA。

● 保 存

-20℃保存。

● 扩增片段大小

EV Universal、EV71、CA16 RNA 及 Internal Control DNA 扩增片段大小区别。

Target	EV Universal	EV71	CA16	Internal Control
Size	146 bp	158 bp	186 bp	约 440 bp

●原理

本试剂盒可以在同一反应管中连续进行PrimeScript™ RTase将RNA反转录成cDNA，再以cDNA为模板由TaKaRa Ex Taq™ HS进行PCR扩增反应，然后对扩增产物进行检测（原理见图1）。

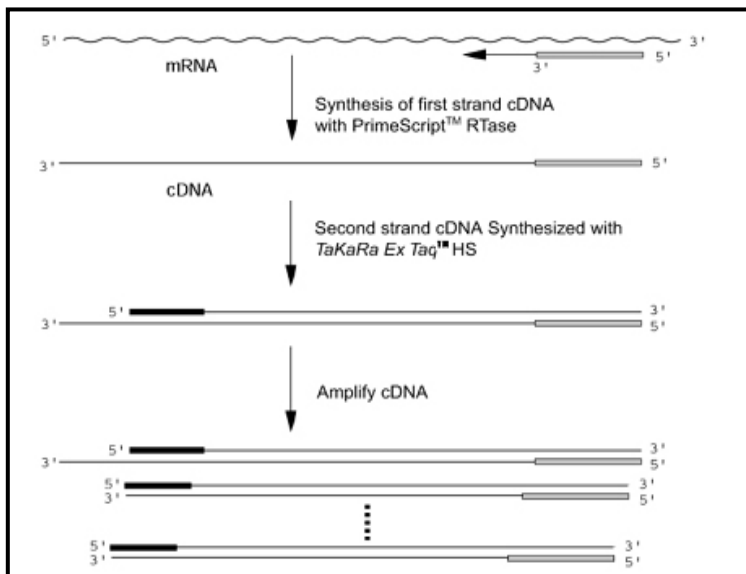


图1. One Step RT-PCR原理图

●RNA 样品制备

本试剂盒是把RNA合成cDNA，然后再对此cDNA进行扩增的试剂盒。RNA的纯度会影响cDNA的合成量，而制备RNA的关键是要抑制细胞中的RNA分解酶和防止所用器具及试剂中的RNA分解酶的污染。因此，在实验中必须采取以下措施：戴一次性干净手套；使用RNA操作专用实验台；在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的RNA分解酶的污染。

【使用器具】

尽量使用一次性塑料器皿，若用玻璃器皿，应在使用前按下列方法进行处理。

用0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在37℃下处理12小时。

然后在120℃下高压灭菌30分钟以除去残留的DEPC。

RNA实验用的器具和仪器建议专门使用，不要用于其它实验。

【试剂配制】

用于RNA实验的试剂，须使用干热灭菌（180℃，60 min）或用上述方法进行DEPC水处理灭菌后的玻璃容器盛装（也可使用RNA实验用的一次性塑料容器），使用的无菌水须用0.1%的DEPC处理后进行高温高压灭菌。

RNA实验用的试剂和无菌水都应专用，避免混用后交叉污染。

【制备方法】

EV为感染性及危害性很大的RNA病毒，其RNA制备需要在极其严格的环境条件下进行。进行EV RNA样品制备时，我们推荐使用本公司的病毒RNA/DNA快速纯化试剂盒 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.3.0（TaKaRa Code: DV818A）。

●注意事项

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前一定认真阅读。

1. 人类肠道病毒具有高度传染性，样品的采集、处理、保存、运输、检测实验均应遵循国家相应的管理规定和生物安全条例。必须做好相关的保护措施，以确保实验人员安全。

2. 本试剂盒检测灵敏度高, 为了防止污染, 实验要分区操作。
 - ① 第一区: 反应液配制区。
 - ② 第二区: 样品制备区。
 - ③ 第三区: 样品添加区及反应检测区。
 三个区间必须进行物理性隔离, 以避免人为因素造成污染。
3. 本试剂盒所使用的 Positive Control RNA 是通过人工合成 DNA 后, 再经体外转录得到的。使用安全, 无感染性。
4. 当同时需要进行数次 RT-PCR 反应时, 应先配制各种试剂的混合液, 然后再分装到每个反应管中。这样, 可使所取的试剂体积更准确, 减少试剂损失, 避免重复分取同一试剂。同时也可以减少实验操作或实验之间产生的误差。
5. 使用 PrimeScript One Step Enzyme Mix 时, 应轻轻混匀, 避免起泡; 分取之前要小心离心收集到反应管底部; 由于酶保存液中含有 50% 的甘油, 粘度高, 分取时应慢慢吸取。
6. 2×One Step Buffer 使用前用 Vortex 充分混匀, 离心后使用。
7. 酶制品应在实验前才从 -20℃ 中取出, 使用后也应立即放回 -20℃ 中保存。
8. 反应液的配制、分装请一定使用新的 (无污染的) 枪头、Microtube 等, 尽量避免污染。
9. 为了防止 Control RNA 分解, 应尽量避免反复冻融, 若条件允许, 尽量于 -70℃ ~ -80℃ 保存。

● 实验操作

1. 按下列组成配制 RT-PCR 反应液。

PrimeScript One Step Enzyme Mix	2 μl
2×One Step Buffer	25 μl
Primer Mixture	1 μl
样品 RNA*	X μl
RNase Free dH ₂ O	Up to 50 μl

* Negative Control 反应时, 用 RNase Free dH₂O 替代样品 RNA。

Positive Control 反应时, 用 Control RNA 替代样品 RNA。

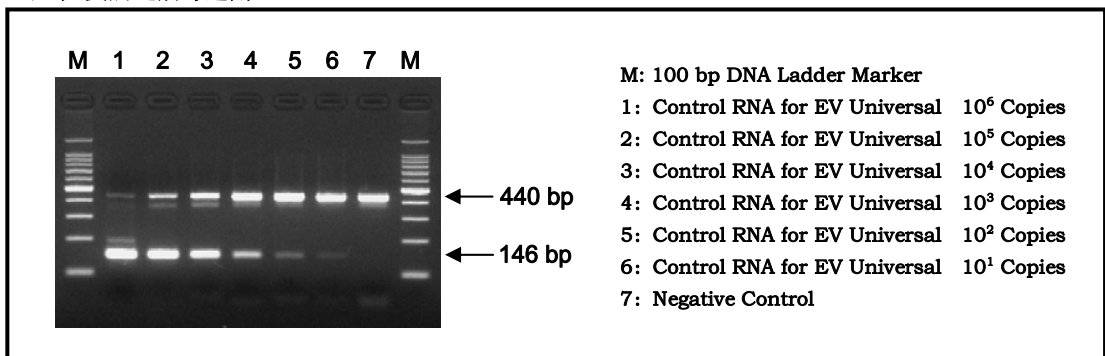
2. 按以下条件进行 RT-PCR 反应。

50℃	30 min	} 40 Cycles
94℃	2 min	
94℃	30 sec	
55℃	30 sec	
72℃	30 sec	

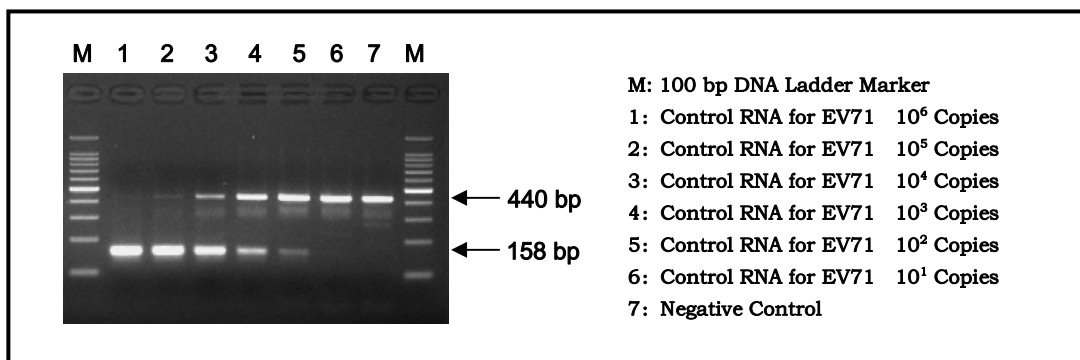
3. 反应结束后, 取 5 μl PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 确认 PCR 扩增产物。
4. 结果。

以 Control 反应为例, Negative Control 反应时, 用 RNase Free dH₂O 替代样品 RNA; Positive Control 反应时, 将试剂盒附带的 Control RNA 使用 EASY Dilution (TaKaRa Code: D9160) 按 10 倍梯度稀释成 10~1×10⁶ Copies/μl, 分别取 1 μl 为模板, 进行 RT-PCR 反应, 结果如下。

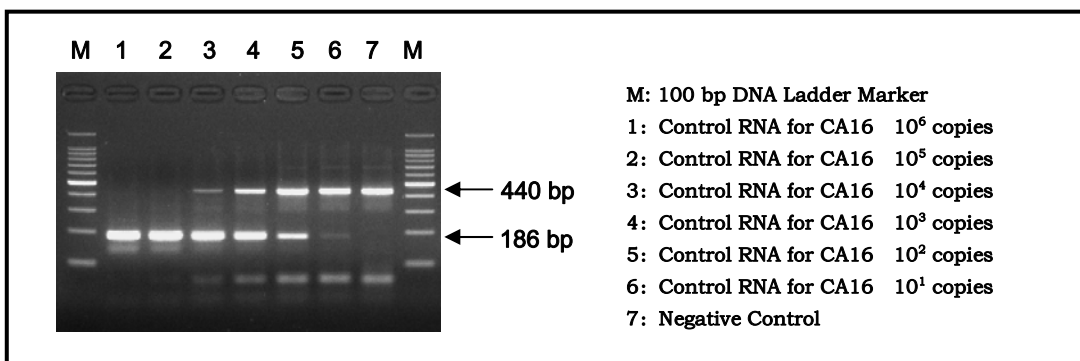
A) 人类肠道病毒通用型 EV



B) 人类肠道病毒特异型 EV71



C) 人类肠道病毒特异型 CA16



5. 结果分析。

请参见“结果判定”部分。

● 结果判定

为确保检测结果的准确性，在进行实际样品检测时，请务必同时进行 Negative Control 实验和 Positive Control 实验。Negative Control 实验可以避免假阳性结果出现；Positive Control 实验可以避免假阴性结果出现。

1. Negative Control 实验

在配制 One Step RT-PCR 反应液时，用 RNase Free dH₂O 替代检测样品。对各种实验结果的判定情况说明见下表。

Internal Control	EV Universal	EV71	CA16	结果判定
+	-	-	-	结果正常。
-	-	-	-	可能是操作失败或试剂失活。
+/-	+	+	+	PCR 反应体系污染。在确保反应体系不被污染的情况下再次进行 PCR 反应。

2. Positive Control 实验

在配制反应液时，用Positive Control RNA (10⁶ Copies) 替代检测样品。对各种实验结果的判定情况说明见下表。

Internal Control	EV Universal	EV71	CA16	结果判定
+/-	+	+	+	结果正常。
+	-	-	-	PCR 反应失败。可能是未添加 Positive Control RNA 或 Positive Control RNA 分解。
-	-	-	-	PCR 反应失败。可能是实验操作失败或试剂失活。

3. 实际样品的检测

检测实际样品时对各种实验结果的判定情况说明见下表。

Internal Control	EV Universal	EV71	CA16	结果判定
+	-	-	-	如果同时进行的 Positive Control 实验结果正常，检测实际样品时，只有内参照 440 bp 扩增，无任何目的片段扩增，则可以判定为阴性或样品中 EV RNA 含量在检测界限以下。
+/-	+	-	+	如果同时进行的 Negative Control 实验结果正常，检测实际样品时，不管是否有 440 bp 扩增（如果检测样品浓度高会抑制 Internal Control DNA 的扩增），只要有 EV Universal 和 CA16 目的片段扩增，则可以判定 CA16 阳性。
+/-	+	+	-	如果同时进行的 Negative Control 实验结果正常，检测实际样品时，不管是否有 440 bp 扩增（如果检测样品浓度高会抑制 Internal Control DNA 的扩增），只要有 EV Universal 和 EV71 目的片段扩增，则可以判定 EV71 阳性。
+/-	+	+	+	如果同时进行的 Negative Control 实验结果正常，检测实际样品时，不管是否有 440 bp 扩增（如果检测样品浓度高会抑制 Internal Control DNA 的扩增），只要有 EV Universal、EV71 和 CA16 目的片段扩增，则可以判定 EV71 和 CA16 阳性。
+/-	+	-	-	如果同时进行的 Negative Control 实验结果正常，检测实际样品时，不管是否有 440 bp 扩增（如果检测样品浓度高会抑制 Internal Control DNA 的扩增），只有 EV Universal 目的片段扩增，则可以判定含有非 EV71、CA16 的其他肠道病毒。
-	-	-	-	PCR 反应失败。注意以下几个方面后再次进行实验。 ① 如果同时进行的 Positive Control 实验结果正常，则可能是样品 DNA 制备有问题，如样品中可能存在 PCR 反应的抑制物等。 ② 如果同时进行的 Positive Control 实验结果不正常，则可能是实验操作失败或试剂失活。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
8008909508, 4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话： 0411-87641681 87641683

传 真： 0411-87619946 87621675

E.mail: service@takara.com.cn

网 址： <http://www.takara.com.cn>

V2010.04

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂