

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:15-81920

低温运输，-20℃保存

**BINGENE**

新型冠状病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒

SARS-Cov-2 Probe qRT-PCR Kit

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: [www.bingene.com](http://www.bingene.com); 电话: 400-6005850; 电邮: [order@bingene.com](mailto:order@bingene.com)

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |              |             |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------|
| 产品及特点 | <p>新型冠状病毒（SARS-Cov-2）是单股正链 RNA 病毒，发现于 2019 年。人感染了冠状病毒后常见体征有呼吸道症状、发热、咳嗽、气促和呼吸困难等。在较严重病例中，感染可导致肺炎、严重急性呼吸综合征、肾衰竭，甚至死亡。对于新型冠状病毒所致疾病没有特异治疗方法，因此快速灵敏诊断新型冠状病毒具有重要意义。本产品就是以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测新型冠状病毒的试剂盒，它具有下列特点：</p> <p>1. 即开即用，用户只需要提供样品 RNA 模板。</p> <p>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。</p> <p>3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。</p> <p>4. 特异性高，引物是根据新型冠状病毒 RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。</p> <p>5. 涵盖性好，可以扩增新型冠状病毒的大多数亚型。</p> <p>6. 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 个数量级。</p> <p>7. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。</p> <p>8. 本产品只能用于科研。</p> |              |             |
| 规格及成分 | 成分                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 编号           | 五孔盒包装       |
|       | 探针法 qRT-PCR 缓冲液                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 990504a      | 500 μL（蓝盖管） |
|       | 探针法 qRT-PCR 酶混合液                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 990504b      | 100 μL（红盖管） |
|       | 荧光 PCR 专用模板稀释液                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 180701       | 1 mL（绿盖管）   |
|       | 新型冠状病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | yp15-81920yx | 150 μL（棕色管） |
|       | 新型冠状病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Pc15-81920   | 50 μL（黄盖管）  |
|       | 使用手册                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 15-81920 sc  | 1 份         |
| 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  | <p>一、<b>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>                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |              |             |

2. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu\text{L}$  荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。
3. 在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^6$  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，最好设置 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制备要求的体积一样，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最后加）：

| 成分                         | 样品管<br>N+2 个       | RT-PCR<br>阴性对照   | 标准曲线样品管<br>(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           | 各 2 $\mu\text{L}$  | 2 $\mu\text{L}$  | 各 2 $\mu\text{L}$  |
| 新型冠状病毒 qRT-PCR<br>引物-探针混合液 | 各 3 $\mu\text{L}$  | 3 $\mu\text{L}$  | 各 3 $\mu\text{L}$  |
| N+2 个待测 RNA 样本             | 各 5 $\mu\text{L}$  | 不加               | 不加                 |

|                                                                                                                                                        |                                                                                                          |     |                                     |                                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------------------------------|---------------------------------|
|                                                                                                                                                        | 超纯水                                                                                                      | 不加  | 5 μL                                | 不加                              |
|                                                                                                                                                        | 第 6 步所得标准曲线样品稀释液<br>(1-6 号)                                                                              | 不加  | 不加                                  | 各 5μL (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管…) |
|                                                                                                                                                        | 11. 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                                                                                                      | 42℃ | 30 min                              |                                 |
|                                                                                                                                                        | 预变性                                                                                                      | 95℃ | 15 min                              |                                 |
|                                                                                                                                                        | PCR 反应<br>(45 个循环)                                                                                       | 94℃ | 15 sec                              |                                 |
|                                                                                                                                                        |                                                                                                          | 55℃ | 45 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, BHQ1 为淬灭基团) |                                 |
|                                                                                                                                                        | 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, 则阴性对照必须没有 Ct 值, 或 Ct 值大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长, 有典型扩增曲线, Ct 值必须小于 40。对待测样品, 如果没有 Ct 值, 或 Ct 值大于或等于 40 则判为阴性, 如果小于 40 则判为阳性。 |                                                                                                          |     |                                     |                                 |
| 关联产品                                                                                                                                                   | 新型冠状病毒荧光及可视化 RT-LAMP 检测试剂盒                                                                               |     |                                     |                                 |