

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; 电话: 400-6005850; 电邮: 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> <ol style="list-style-type: none"> 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。 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。 5. 涵盖性好，可以扩增新型冠状病毒的大多数亚型。 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。 7. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。 8. 本产品只能用于科研。 																					
规格及成分	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">成分</th><th style="text-align: center;">编号</th><th style="text-align: center;">五孔盒包装</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">探针法 qRT-PCR 缓冲液</td><td style="text-align: center;">990504a</td><td style="text-align: center;">500 μL (蓝盖管)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">探针法 qRT-PCR 酶混合液</td><td style="text-align: center;">990504b</td><td style="text-align: center;">100 μL (红盖管)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td style="text-align: center;">180701</td><td style="text-align: center;">1 mL (绿盖管)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">新型冠状病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液</td><td style="text-align: center;">yp15-81920yx</td><td style="text-align: center;">150 μL (棕色管)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">新型冠状病毒 RT-PCR 阳性对照 (1 × 10E7 拷贝 / μL)</td><td style="text-align: center;">Pc15-81920</td><td style="text-align: center;">50 μL (黄盖管)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">使用手册</td><td style="text-align: center;">15-81920 sc</td><td style="text-align: center;">1 份</td></tr> </tbody> </table>	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
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、稀释标准曲线样品（以 10E1-10E6 拷贝 / μL 这 6 个 10 倍稀释度为例）。</p> <p>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> <ol style="list-style-type: none"> 1. 标记 6 个离心管，分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。 																					

-
2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 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 μL 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^6 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
 4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
 5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1×10^5 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^4 拷贝/ μL 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 μL 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 μL 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最后加）：

成分	样品管 N+2 个	RT-PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 μL	2 μL	各 2 μL
新型冠状病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测 RNA 样本	各 5 μL	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 (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 (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

20220301fn