|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:17-60140****低温运输，-20℃保存** |  |
| **MS2噬菌体探针法qRT-PCR试剂盒****MS2 PhageProbe 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** |
| **产品及特点** | 大肠杆菌MS2噬菌体是二十面体的单链正义RNA病毒，可感染大肠杆菌和肠杆菌科的其他成员。MS2噬菌体属于轻巧病毒(Levivirus)家族的成员，其中包括噬菌体f2、噬菌体Qβ、噬菌体R17和噬菌体GA。其基因组含有3569个核苷酸，编码成熟酶蛋白、衣壳蛋白、复制酶蛋白和裂解蛋白四种蛋白。与其组装相关的蛋白为成熟酶蛋白和衣壳蛋白。今年，MS2噬菌体常用于构建RNA诊断产品用的阳性质控品。因此快速检测MS2噬菌体具有重要意义。本产品就是以探针法qRT-PCR技术为基础开发的专门检测MS2噬菌体的试剂盒，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. 提供阳性对照和内参，便于排除假阴性结果。
4. 特异性高，引物是根据MS2噬菌体RNA高度保守区设计，不会跟其他生物的RNA发生交叉反应。
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。
6. 本产品足够50次20μL体系的探针法RT-PCR反应。
7. 本产品只能用于科研。
 |
| **规格及成分** | 本产品使用五孔盒包装

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 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 |
| MS2噬菌体RT-PCR引物-探针干粉（含内参探针） | yp17-60140 | 50次 | 0.5mL棕色管 |
| MS2噬菌体阳性对照(1×10E7拷贝/μL) | pc15-60140  | 50 μL | 0.5mL黄盖管 |
| MS2噬菌体RT-PCR内参(1×10E4拷贝/μL) | icpc17-60140 | 250 μL | 0.5mL白盖管 |
| 使用手册 | 17-60140sc | 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220uL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、稀释含内参的标准曲线样品**（以阳性对照10E1-10E6拷贝/μL这6个10倍稀释度和内参固定在10E3拷贝/μL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）。1. 标记6个离心管，分别为6，5，4，3，2，1，0。
2. 在0号管中加入280μL荧光PCR专用模板稀释液，35μL本试剂盒提供的内参，震荡一分钟混匀。内参的浓度为1111拷贝/μL。
3. 用带芯枪头分别将上步得到的混合液按45μL/管加入到标记的1-6号管中，每管中含内参50000拷贝。最好用带芯枪头（下同）。
4. 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拷贝/μL的标准曲线PC样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在5号管中加入5 μL 1×10E6拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E5拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 换枪头，在4号管中加入5 μL 1×10E5拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E4拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
7. 重复上面的操作直到得到6个稀释度的标准曲线阳性样品，每个样品中内参的浓度固定为10E3拷贝/μL，总拷贝数为5×10E4。放冰上待用。

**二、样品RNA的制备**1. 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10μL第6步所得4号稀释液再加上一定量的水使总体积跟样本制备试剂盒所要求的样本体积一样，以此作为PC（共含5×10E5拷贝阳性对照和5×10E4拷贝内参）。另外用水作为NC，但需要加入5μL本试剂盒提供的内参（共5×10E4拷贝），水和内参的总体积需要跟样本制备试剂盒所要求的样本体积一样。
2. 用自选方法纯化样品的RNA（含内参），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（20μL体系，在样品制备室进行）**1. 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。
2. 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+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 |
| MS2噬菌体RT-PCR引物-探针混合液(含内参引物) | 各4 μL | 4 μL | 各4 μL |
|  N+2个待测RNA（含内参） | 各4 μL | 不加 | 不加 |
| 超纯水 | 不加 | 4 μL | 不加 |
| 第6步所得标准曲线样品稀释液（含内参，1-6号） | 不加 | 不加 | 各4μL（2号样到2号管，3号样到3号管…） |

1. 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 |
| 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**1. 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。对任何阴性样品，如果内参无Ct，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。
2. 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，分别以阳性对照（FAM通道）和内参（HEX通道）的Ct值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照的标准曲线为斜线，r2必须大于0.95，内参的标准曲线为一条跟X轴平行的横线。再以待测样品的Ct值从阳性对照的标准曲线上推算出样品RNA浓度的log值，再推算出其浓度。
3. 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35。对待测样品，如果其Ct大于或等于40则为阴性，如果小于或等于35则为阳性。如果在35-40之间，则重复一次。重复实验的Ct值如果大于或等于40则为阴性，如果小于40，则为阳性。对任何FAM通道结果为阴性的样品，如果其对应的内参HEX通道无Ct，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。
 |
| **关联产品** | MS2噬菌体荧光及可视化LAMP检测试剂盒 |

20220128fn