

## 新型冠状病毒 orf1ab 基因探针法 qRT-PCR 试剂盒

### SARS-Cov-2 orf1ab Gene Probe qRT-PCR Kit

**CAT#: BN64779**

低温运输, -20℃保存

<b>产品及特点</b>	<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。新型冠状病毒的 orf1ab 基因含有相互重叠的 orf1a 和 orf1b 两个开放阅读框, 分别编码病毒复制蛋白 large replicase polyprotein 1a (pp1a) 和 pp1ab。其序列高度保守, 是最佳检测靶点之一。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 orf1ab 基因的试剂盒, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. 即开即用, 用户只需要提供样品 RNA 模板。</li><li>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。</li><li>3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。</li><li>4. 特异性高, 引物是根据新型冠状病毒 orf1ab 基因的保守区设计, 不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。</li><li>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 个数量级。</li><li>6. 本产品足够 50 次 20 <math>\mu</math>L 体系的探针法 qRT-PCR 反应。</li><li>7. 本产品只能用于科研。</li></ol>
--------------	---

规格及成分	成分	编号	五孔盒包装
	探针法 qRT-PCR 缓冲液	60001	500 $\mu$ L (蓝盖管)
	探针法 qRT-PCR 酶混合液	60002	100 $\mu$ L (红盖管)
	荧光 PCR 专用模板稀释液	60003	1 mL (绿盖管)
	新型冠状病毒 orflab 基因 qRT-PCR 引物-探针混合液	64779-4	150 $\mu$ L (棕色管)
	新型冠状病毒 orflab 基因 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10 <sup>7</sup> 拷贝/ $\mu$ L)	64779-5	50 $\mu$ L (黄盖管)
	使用手册		1 份
运输及保存	低温运输, -20 $^{\circ}$ C 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/<math>\mu</math>L 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> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 标记 6 个离心管, 分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。</li> <li>2. 用带芯枪头分别加入 45 <math>\mu</math>L 荧光 PCR 专用模板稀释液, 最好用带芯枪头, 下同)。</li> <li>3. 在 6 号管中加入 5 <math>\mu</math>L 1<math>\times</math>10<sup>7</sup> 拷贝/<math>\mu</math>L 的阳性对照 (试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1<math>\times</math>10<sup>6</sup> 拷贝/<math>\mu</math>L 的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>4. 换枪头, 在 5 号管中加入 5 <math>\mu</math>L 1<math>\times</math>10<sup>6</sup> 拷贝/<math>\mu</math>L 的阳性对照 (上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1<math>\times</math>10<sup>5</sup> 拷贝/<math>\mu</math>L 的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>5. 换枪头, 在 4 号管中加入 5 <math>\mu</math>L 1<math>\times</math>10<sup>5</sup> 拷贝/<math>\mu</math>L 的阳性对照 (上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1<math>\times</math>10<sup>4</sup> 拷贝/<math>\mu</math>L 的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>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。</li> </ol> <p>二、<b>样品 RNA 的制备</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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 <math>\mu</math>L 上步所得 4 号稀释液再加上一一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。</li> <li>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,</li> </ol>		

也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

### 三、Probe qRT-PCR 反应 (20 $\mu$ 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 $\mu$ L	10 $\mu$ L	各 10 $\mu$ L
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	各 2 $\mu$ L
新型冠状病毒 orf1ab 基因 qRT-PCR 引物-探针混合液	各 3 $\mu$ L	3 $\mu$ L	各 3 $\mu$ L
N+2 个待测 RNA 样本	各 5 $\mu$ L	不加	不加
超纯水	不加	5 $\mu$ L	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 5 $\mu$ L (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 $^{\circ}$ C	30 min
预变性	95 $^{\circ}$ C	15 min
PCR 反应 (45 个循环)	94 $^{\circ}$ C	15 sec
	55 $^{\circ}$ C	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

	<p>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。</p> <p>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。</p>
关联产品	新型冠状病毒荧光及可视化 RT-LAMP 检测试剂盒