

新型冠状病毒 orflab-N 片段探针法 qRT-PCR 试剂盒

SARS-Cov-2 orflab-N Region Probe qRT-PCR Kit

CAT#: BN64780

低温运输, -20℃保存

<p>产品及特点</p>	<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 orflab-N 片段是 orflab 基因和 N 基因之间的区域, 其序列高度保守, 常作为检测靶点。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 orflab-N 片段的试剂盒, 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 orflab-N 片段的保守区设计, 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 个数量级。 6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。 7. 本产品只能用于科研。 																				
<p>规格及成分</p>		<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>探针法 qRT-PCR 缓冲液</td> <td>60001</td> <td>500 μL</td> </tr> <tr> <td>探针法 qRT-PCR 酶混合液</td> <td>60002</td> <td>100 μL</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>60003</td> <td>1 mL</td> </tr> <tr> <td>新型冠状病毒 orflab-N 片段 qRT-PCR 引物-探针混合液</td> <td>64780-4</td> <td>150 μL</td> </tr> <tr> <td>新型冠状病毒 orflab-N 片段 RT-PCR 阳性对照 (1\times10⁷ 拷贝/μL)</td> <td>64780-5</td> <td>50 μL</td> </tr> </tbody> </table>	成分	编号	包装	探针法 qRT-PCR 缓冲液	60001	500 μ L	探针法 qRT-PCR 酶混合液	60002	100 μ L	荧光 PCR 专用模板稀释液	60003	1 mL	新型冠状病毒 orflab-N 片段 qRT-PCR 引物-探针混合液	64780-4	150 μ L	新型冠状病毒 orflab-N 片段 RT-PCR 阳性对照 (1 \times 10 ⁷ 拷贝/ μ L)	64780-5	50 μ L	
成分	编号	包装																			
探针法 qRT-PCR 缓冲液	60001	500 μ L																			
探针法 qRT-PCR 酶混合液	60002	100 μ L																			
荧光 PCR 专用模板稀释液	60003	1 mL																			
新型冠状病毒 orflab-N 片段 qRT-PCR 引物-探针混合液	64780-4	150 μ L																			
新型冠状病毒 orflab-N 片段 RT-PCR 阳性对照 (1 \times 10 ⁷ 拷贝/ μ L)	64780-5	50 μ L																			

本产品仅用于科研

	使用手册		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）。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\times10E7 拷贝/μL 的阳性对照（试剂盒提供），充分震荡 1 分钟，得 1\times10E6 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\times10E6 拷贝/μL 的阳性对照（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 1\times10E5 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\times10E5 拷贝/μL 的阳性对照（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 1\times10E4 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。 <p>二、样品 RNA 的制备</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。 <p>三、Probe qRT-PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）</p>		

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 μ L	10 μ L	各 10 μ L
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
新型冠状病毒 orflab-N 片段 qRT-PCR 引物-探针混合液	各 3 μ L	3 μ L	各 3 μ L
N+2 个待测 RNA 样本	各 5 μ L	不加	不加
超纯水	不加	5 μ 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 μ 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>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