天净沙系列

CAT#:15-30000

低温运输，-20℃保存

天净沙

埃博拉病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒

Ebola Virus Probe qRT-PCR Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

埃博拉病毒(Ebola Virus,EBOV)是一种单股负链 RNA 病毒，包含 18959 个碱基。埃博拉病毒属丝状病毒科，呈长丝状体，长度为 970 nm，直径大约 80 nm。埃博拉病毒病是由埃博拉病毒引起的一种罕见但严重的人类疾病，可通过野生动物感染人类，然后通过与感染者的血液、分泌物、器官或其它体液以及被这些液体污染的表面和材料的直接接触而在人类群体中传播。埃博拉病毒病潜伏期一般为 5 到 12 天，初始表现为发热、头痛、关节/肌肉和腹痛、伴有腹泻和呕吐。调查显示，埃博拉病毒病平均病死率约为 50%，在以往爆发的疫情中出现的病死率从 25%到 90%不等。由于埃博拉病毒感染初期症状无特异性，因此对埃博拉病毒的快速灵敏诊断具有重要意义。本产品以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测埃博拉病毒的试剂盒，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/μL。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据埃博拉病毒 RNA 高度保守区设计，不会跟其他的 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。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
探针法 RT-PCR 缓冲液	990504a	0.5 mL	0.5 mL 蓝盖管
探针法 RT-PCR 酶混合液 v2	990504bv2	50 μL	0.5 mL 红盖管
荧光 PCR 模板专用稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
埃博拉病毒 qRT-PCR 引物-探针干粉	yp15-30000kw	50 次	1.5 mL 棕色管
埃博拉病毒 qRT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	pc30050-MW797132-NP	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	15-30000sc	1 份	无

注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165 μL 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，超纯水。

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以 1E1-1E6 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。

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 1E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 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 1E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 重复上面的操作直到得到 6 稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

二、样品 RNA 的制备

6. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是样品制备 PC（样品制备阳性对照），一个是样品制备 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10μL 阳性对照的 10000 倍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，以此作为样品制备 PC。另外用水作为样品制备 NC。
7. 用自选方法纯化样品的 RNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒 RNA 提取试剂盒兼容。

三、设置 qRT-PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

8. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），5 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 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 PCR 阳性对照（用试剂盒提供的阳性对照的 10000 倍稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
9. 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	PCR 阴性 对照管	标准曲线 样品管（1-6 管）
探针法 qRT-PCR 缓冲液	10 μL	10 μL	各 10 μL

探针法 qRT-PCR 酶混合液	1 μL	1 μL	各 1 μL
埃博拉病毒探针法 qRT-PCR 引物-探针混合液	3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测 RNA 模板	6 μL	不加	不加
超纯水	不加	6 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 6 μL（1 号样到 1 号管，2 号样到 2 号管…）

10. 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℃	10 min
预变性	95℃	5 min
PCR 反应（32 个循环）	95℃	15 sec
	63℃	30 sec
	72℃	30 sec（采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA）

四、数据处理

11. 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。
12. 如果阴性对照和阳性对照正常，则实验有效，可以进入后续分析。
13. 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。
14. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 大于或等于 32。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于 32，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 32，则为阴性。如果 Ct 小于 32 则为阳性。

关联产品	埃博拉病毒可视化 LAMP 检测试剂盒