天净沙系列

CAT#:15-13300-13310

低温运输，-20℃保存

天净沙

汉滩型汉坦病毒/汉城型汉坦病毒双重探针法 PCR 试剂盒

Hantaan Virus and Seoul Virus Duplex Probe PCR Kit

使用手册 V0.53

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

本产品就是以探针法 PCR 技术为基础开发的专门检测汉滩型汉坦病毒和汉城型汉坦病毒的试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 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，便于排除假阴性结果。
4. 特异性高，引物是根据汉滩型汉坦病毒和汉城型汉坦病毒 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
5. 可用于定性检测，不推荐用于定量检测。
6. 汉滩型汉坦病毒和汉城型汉坦病毒分别用 FAM 和 Cy5 标记，检测和分型同时完成。
7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
8. 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
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5 mL 本色管
荧光 PCR 模板专用稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
汉滩型汉坦病毒/汉城型汉坦病毒 PCR 引物-探针干粉	yp15-13300-13310	50 次	1.5 mL 棕色管
汉滩型汉坦病毒阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	pc15-13300	50 μL	0.5 mL 黄盖管
汉城型汉坦病毒阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	pc15-13310	50 μL	0.5 mL 白盖管
使用手册	sc15-13300-13310	1 份	无

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 DNA，超纯水。

使用方法

一、样品 DNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，最好设置 N+3 个提取，多出的两个分别是汉滩型汉坦病毒和汉城型汉坦病毒的 PPC（样品制备阳性对照），另一个是 PNC（样品制备阴性对照）。可以用自备的、确定是阳性的样本作为 PPC，可以用自备的、确定是阴性的样本作为 PNC。如没有，可以用 10 μL 本产品提供的汉滩型汉坦病毒阳性对照（1E4 拷贝/μL）和汉城型汉坦病毒阳性对照（1E4 拷贝/μL）再加上一定量的水，使总体积跟样本制备试剂盒所要求的起始样本体积一样，以此分别作为两个 PC，另外用水作为 NC，水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 DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。也

可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

二、Probe PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

3. 首次使用本试剂盒时，将 PCR 引物-探针干粉管短暂离心，然后在离心管中加入 220 μL 的超纯水，涡旋混匀 30 秒后得 PCR 引物-探针混合液，放冰上待用。未用完的需要-20℃保存。

4. 如果只做 1 次重复，则标记 N+3+3 个 PCR 管，其中 N+3 个用于上步得到的 N+3 个样品，另外两个分别用于汉滩型汉坦病毒和汉城型汉坦病毒扩增阳性对照（APC），1 个用于扩增阴性对照（ANC，用水做模板）。

5. 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	N+3 个样品管	ANC 管	汉滩型汉坦病毒 APC 管	汉城型汉坦病毒 APC 管
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
PCR 引物-探针混合液	各 4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
N+3 个待测 DNA 样本	各 6 μL	不加	不加	不加
超纯水	不加	6 μL	不加	不加
汉滩型汉坦病毒阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	6 μL	不加
汉城型汉坦病毒阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	不加	6 μL

6. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR:

过程	温度	时间
预变性	95℃	10 min
PCR 反应（45 个循环）	95℃	15 sec
	52℃	15 sec
	60℃	60 sec（采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

三、数据处理

7. 根据以下表格，判断所有对照反应结果的阳性或阴性:

信号通道	判断标准	结果
FAM	Ct 值小于 40 且扩增曲线呈倒 S 型	FAM 阳性
	Ct 值大于等于 40	FAM 阴性
	无 Ct 值	FAM 阴性

Cy5	Ct 值小于 40 且扩增曲线呈倒 S 型	Cy5 阳性
	Ct 值大于等于 40	Cy5 阴性
	无 Ct 值	Cy5 阴性

1. 制备实验有效性确定：若两个 PPC 分别为 FAM 及 Cy5 阳性且 PNC 为 FAM 和 Cy5 阴性，则 DNA 制备实验有效，可继续后续分析。若汉滩型汉坦病毒 PPC 为 FAM 阴性或汉城型汉坦病毒 PPC 为 Cy5 阴性，则整个 DNA 制备实验无效，无需进行后续分析，必须重复 DNA 制备实验。导致纯化失效的可能原因包括：DNA 制备试剂盒失效、制备实验操作失误、PCR 仪器故障，或 PNC 样本受到既往实验残留污染或其他阳性样本交叉污染。
2. 扩增实验有效性判断：若汉滩型汉坦病毒 APC 为 FAM 阳性，汉城型汉坦病毒 APC 为 Cy5 阳性，且 ANC 为 FAM 和 Cy5 阴性，则 PCR 扩增实验有效，可继续后续分析。若汉滩型汉坦病毒 APC 为 FAM 阴性，或汉城型汉坦病毒 APC 为 Cy5 阴性，或 ANC 为 FAM 或 Cy5 阳性，则整个 PCR 扩增实验无效，无需进行后续分析，必须查明扩增失败原因。可能原因包括：PCR 试剂失效、PCR 仪器故障、ANC 样本受到既往实验残留污染或其他阳性样本交叉污染。
3. 若制备与扩增实验均有效，则进行样本结果分析。如果某待测样品 FAM Ct 大于或等于 40，则为汉滩型汉坦病毒阴性；如果小于 40 则为汉滩型汉坦病毒阳性。如果某待测样本的 Cy5 Ct 大于或等于 40，则为汉城型汉坦病毒阴性；如果小于 40 则为汉城型汉坦病毒阳性。

关联产品	汉滩型汉坦病毒/汉城型汉坦病毒双重探针法 qPCR 试剂盒 v2.0