天净沙系列

CAT#:20-83700

低温运输，-20℃保存

天净沙

新型布尼亚病毒探针法 RNA 恒温扩增试剂盒

Novel Bunyavirus Probe RNA Isothermol Amplification 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

本公司开发了针对新型布尼亚病毒的探针法 RNA 恒温扩增试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供病毒 RNA 样品。
2. 恒温扩增，可以不需要贵重的荧光 PCR 等贵重仪器。
3. 含探针，可以进一步提高专一性。
4. 特异性高，扩增引物和检测探针均根据新型布尼亚病毒 RNA 保守序列设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
5. 一般 90 分钟内出结果。
6. 提供无传染性的阳性对照，便于分析实验结果。
7. 提供内参，便于识别假阴性。
8. 本产品只能用于定性分析，不推荐用于定量分析。
9. 上样量大，对 20 μL 的反应体系，最大样品加样量高达到 8 μL。
10. 内含的 dUTP-UNG 可防交叉污染。
11. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 RNA 恒温扩增。
12. 只可用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装
RNA 恒温扩增 MasterMix（探针法，待加酶）	220305a	300 μL	0.5 mL 绿盖管
逆转录酶-扩增酶混合液	211208b	100 μL	0.5 mL 红盖管
20×新型布尼亚病毒 RNA 恒温扩增引物探针混合液干粉（含内参引物探针）	yp20-83700ss	50 次	0.5 mL 棕色管
新型布尼亚病毒 RNA 恒温扩增阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc83700-LC579714-L	250 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	20-83700sc	1 份	无

注意：首次使用本产品的时候，需要在引物探针混合液干粉（含内参引物探针）中加入 220 μL 的自备超纯水，涡旋震荡后短暂离心得到引物探针混合液。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。

自备试剂

超纯水、待测样品。

使用方法

一、样品 RNA 的制备

1. 用自选方法纯化样品 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容，包括本公司的免提取的核酸释放剂。

2. 如果有 N 个样品，则需要做 N+2 个样品制备，包括一个样品制备阳性对照（PC）和一个样品制备阴性对照（NC）。PC 用 10 μL 本试剂盒提供的阳性对照（1E4 拷贝/μL）加一定量的水使得其总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样品体积一样，NC 用水替代。

二、探针法荧光 RNA 恒温扩增反应（20 μL 体系）

3. 注意：第一次使用一个新的试剂盒时，必须先将 100 μL 逆转录酶-扩增酶混合液全部加入到 RNA 恒温扩增 MasterMix（探针法，待加酶）中，盖上盖子后轻柔颠倒 1 分钟混匀，然后再取用。

4. 反应设置：如果有 N+2 个 RNA 纯化样品，则最好设置 N+4 个 RNA 恒温扩增，增加一个阴性对照、一个阳性对照。在 N+4 个 PCR 管中加入下列成分：

成分	N+2 个样品管	扩增阴性对照	扩增阳性对照
RNA 恒温扩增 MasterMix（探针法，已加酶）	各 8 μL	8 μL	8 μL
20×新型布尼亚病毒 RNA 恒温扩增引物探针混合液（含内参引物探针）	各 4 μL	4 μL	4 μL
N+2 个样品 RNA	各 6 μL	-	-
超纯水	各 2 μL	8 μL	2 μL
新型布尼亚病毒 RNA 恒温扩增阳性对照（1E4 拷贝/μL）	-	-	6 μL

5. 本产品含两种探针，故在设置荧光 PCR 仪时，设置 90 次循环，每次 65℃保温 1 分钟，采集 FAM 和 Cy5 两个通道的荧光信号。FAM 是样本探针的荧光标记，Cy5 是内参探针的荧光标记，淬灭基团是 MGB 和 BHQ-3。

三、结果分析

6. 判断实验有效性：扩增阴性对照必须没有 FAM 信号的扩增（扩增是指 Ct 在 70 以内，荧光信号呈现标准的 S 型扩增曲线。任何一个不满足此两个条件，均判读为无扩增。下同），扩增阳性对照必须有 FAM 信号的扩增，否则整个实验无效，需要分析原因。扩增阴性对照如果有扩增，表示实验试剂或环境有模板 DNA 的污染。扩增阳性对照没有 FAM 信号的扩增表示试剂盒或扩增设备或操作有问题，需要分别排查。找到原因并解决问题后方可重启实验。

7. 如果实验有效，则可以分析 N+2 个样品的情况。

情况 1、FAM 信号有扩增，则此样品应判为阳性，不论 Cy5 信号有无扩增。

情况 2、FAM 信号无扩增，但 Cy5 信号有扩增，则此样品应判为阴性；

8. 情况 3、FAM 信号和 Cy5 信号均无扩增，此样品应判为假阴性（可能原因之一

	是此样品中有抑制物，也可能核酸在纯化过程中丢失）。此样品需要稀释不同倍数后再测或/和重新进行核酸制备。
关联产品	新型布尼亚病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒