天净沙系列

CAT#:15-81920-4

低温运输，-20℃保存

天净沙

新型冠状病毒 N 基因、Orf1ab 基因、辣椒轻斑驳病毒、猴痘病毒四重探针法 RT-PCR 试剂盒

SARS-CoV-2 N Gene、Orf1ab Gene 、PMMoV、MPXV Quadruplex Probe RT-PCR Kit

使用手册 V0.5

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

本产品是新型冠状病毒 N 基因、Orf1ab 基因、辣椒轻斑驳病毒（PMMoV）、猴痘病毒（MPXV）四重探针法 qRT-PCR 试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品核酸模板。
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，引物和探针分别根据新型冠状病毒 N 基因、Orf1ab 基因、辣椒轻斑驳病毒、猴痘病毒高度保守区设计，不会跟其他生物的核酸发生交叉反应。
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 4 个数量级。
6. 新型冠状病毒 N 基因、Orf1ab 基因、辣椒轻斑驳病毒、猴痘病毒分别用 FAM、HEX、FAM 和 HEX 标记的四个探针检测。
7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 RT-PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用十一孔盒包装

成分	编号	规格	包装
探针法 RT-PCR 缓冲液	990504a	500 μL	0.5mL 蓝盖管
探针法 RT-PCR 酶混合液 v2	990504bv2	100 μL	0.5mL 红盖管
新冠 N 基因、Orf1ab 基因、辣椒轻斑驳病毒、猴痘病毒四重 RT-PCR 引物-探针干粉	Yp15-81920-4	50 次	0.5mL 棕色管
新冠 N 基因阳性对照（1E7 拷贝/μL）	Pc 15-81920	50 μL	0.5mL 棕色管
新冠 Orf1ab 基因阳性对照（1E7 拷贝/μL）	Pc15-81910	50 μL	0.5mL 棕色管
辣椒轻斑驳病毒阳性对照（1E7 拷贝/μL）	Pc15-3240	50 μL	0.5mL 黄盖管
猴痘病毒阳性对照（1E7 拷贝/μL）	Pc15-13600	50 μL	0.5mL 黄盖管
使用手册	15-81920-4sc	1 份	无

注意：在使用前需要短暂离心引物-探针干粉管，然后在离心管中加入 220 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。

自备物品

样品 RNA。

使用方法

一、样品核酸的制备

1. 如果有 N 个样品，最好设置 N+3 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）。可以用自备的、确定是阳性的样本作为样品制备阳性对照，可以用自备的、确定是阴性的样本作为样品制备阴性对照，可以用水替代。

2. 用自选方法纯化样品的核酸（含内参），本试剂盒跟市场上大多数核酸提取试剂盒兼容。

二、Probe RT-PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

3. 如果有 N+3 个核酸提取，则设置 N+6 个 RT-PCR 反应，多出的 3 个 1 个用于 PCR NC，另外 2 个分别用于 2 个待检测物种的 PCR PC。在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复）：

成分	样品管 N+2 个	PCR NC	新冠 N 基因 PC	新冠 Orf1ab 基因 PC
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	各 2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
新冠 N 基因、Orf1ab 基因、辣椒轻斑驳病毒、猴痘病毒四重 RT-PCR 引物-探针混合液	各 4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
N+2 个待测 DNA	各 4 μL	不加	不加	不加
超纯水	不加	4 μL	不加	不加
新冠 N 基因阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	不加	不加	4 μL	不加
新冠 Orf1ab 基因阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	4 μL

成分	样品管 N+2 个	PCR NC	辣椒轻斑驳病毒 PC	猴痘病毒 PC
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	各 2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
新冠 N 基因、Orf1ab 基因、辣椒轻斑驳病毒、猴痘病毒四重 RT-PCR 引物-探针混合液	各 4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
N+2 个待测 DNA	各 4 μL	不加	不加	不加
超纯水	不加	4 μL	不加	不加
辣椒轻斑驳病毒阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	不加	不加	4 μL	不加
猴痘病毒阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	4 μL

4. 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℃	15 min

预变性	95℃	10 min
PCR 反应 （45 个循环）	94℃	30 sec
	60℃	60 sec（采集 FAM、HEX 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

四、数据处理

5. 如果 PPC 和 APC 结果均为阴性，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 PNC 或 ANC 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。
6. 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。
7. 对定性检测，只判断阳性或阴性。

新冠 N 基因、新冠 Orf1ab 基因结果判定		
FAM	Ct 值小于或等于 40	新冠 N 基因阳性
	Ct 值大于 40	新冠 N 基因阴性
HEX	Ct 值小于或等于 40	新冠 Orf1ab 基因阳性
	Ct 值大于 40	新冠 Orf1ab 基因阴性

辣椒轻斑驳病毒、猴痘病毒结果判定		
FAM	Ct 值小于或等于 38	辣椒轻斑驳病毒阳性
	Ct 值大于 38	辣椒轻斑驳病毒阴性
HEX	Ct 值小于或等于 38	猴痘病毒阳性
	Ct 值大于 38	猴痘病毒阴性

关联产品	新型冠状病毒荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒