

上海通蔚

TW—reagent.com 上海通蔚

埃博拉病毒探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

Ebola Virus Probe qRT-PCR Kit

仅

供

科

研

使

用

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 970nm, 直径大约 80nm。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(如果蝠、豪猪和非人类灵长目动)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(如被褥、衣服)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。早期埃博拉病毒容易与其他热带病(疟疾、登革热)相混淆, 至终末出血期才出现具有特征性的内脏和皮下出血、呕血和眼睛充血。如果失血过多, 可导致肾功能衰竭、呼吸困难/衰竭、低体温、休克、弥散性血管内出血和死。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/ μ L。
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 μ L 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	成分	规格	包装
	探针法 RT-PCR 缓冲液	0.5mL	0.5mL 蓝盖管
	探针法 RT-PCR 酶混合液 v2	50 μ L	0.5mL 红盖管
	荧光 PCR 模板专用稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
	超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖
	埃博拉病毒 qRT-PCR 引物-探针干粉	1mL	1.5mL 棕色管
	埃博拉病毒 qRT-PCR 阳性对照(1 \times 10E7 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5mL 黄盖管
	使用手册	1 份	无
	本产品采用五孔盒包装		
	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 μ L 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20 $^{\circ}$ C 保存。		
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。</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 45μL 荧光 PCR 专用模板稀释液, 用带芯枪头, 下同。 3. 在 6 号管中加入 5μL 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 5μL 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 5μL 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 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, 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。 		

8. 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 μ L 体系，在样品制备室进行)

9. 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。

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加）：

成分	样品管 N+2 个	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	2 μ L	2 μ L	2 μ L
埃博拉病毒探针法 qRT-PCR 引物-探针混合液	3 μ L	3 μ L	各 3 μ L
N+2 个待测 RNA 模板	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

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	50 $^{\circ}$ C	15min
预变性	95 $^{\circ}$ C	5min
PCR 反应	95 $^{\circ}$ C	15sec

	(40 个循环)	60°C	60sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 BHQ1)
	<p>四、数据处理</p> <p>12. 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。</p> <p>13. 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。</p> <p>14. 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> <p>15. 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 35。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 35, 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 35, 则为阴性。如果 Ct 小于 35 则为阳性。</p>		
PCR 编号	TW-E11258		
说明书	1 份		
自备试剂	样品 RNA, 超纯水		
运输及保存	低温运输, -20°C保存, 有效期 1 年		

上海通蔚

生产企业: 上海通蔚实业有限公司

公司地址: 上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603

公司电话: 021-54845833

技术支持: 15800441009