

天恩泽系列

CAT#:15-36900

低温运输，-20℃保存

**TIANDZ**

中东呼吸综合征冠状病毒探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus(MERS-CoV)Probe

qRT-PCR Kit

**使用手册 V1.1**

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区西二旗智学苑配套商业用房 B 座二层 212 室

网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

| <p><b>产品及特点</b></p> | <p>MERS (Middle East Respiratory Syndrome) 病毒是一种新型的冠状病毒，这种病毒已经被命名为中东呼吸综合症冠状病毒，大多数 MERS 病毒感染病例发生在沙特。MERS-CoV 最早于 2012 年 9 月在沙特被发现，早期因与 SARS 临床症状相似得名类 SARS 病毒，也成为第 6 种已知的人类冠状病毒，也是过去 10 年内被分离出来的第 3 种。人体内的冠状病毒最早于 1960 年代在英国被分离出来，病毒因其表面皇冠状的突起物而得名。它可能与人、猪、猫、狗、鼠和鸡的呼吸系统感染相关。本产品就是以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测中东呼吸综合征冠状病毒型的试剂盒，它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 即开即用，用户只需要提供样品 RNA 模板。</li> <li>2. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高。</li> <li>3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。</li> <li>4. 特异性高，引物是根据中东呼吸综合征冠状病毒高度保守区设计，不会跟其他病毒的 RNA 发生交叉反应。</li> <li>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。</li> <li>6. 本产品足够 50 次 20<math>\mu</math>L 体系的探针法荧光定量 RT-PCR 反应。</li> <li>7. 本产品只能用于科研。</li> </ol> |  |  |    |    |   |         |   |         |   |        |   |            |   |         |      |            |
|---------------------|--|--|--|----|----|---|---------|---|---------|---|--------|---|------------|---|---------|------|------------|
| <p><b>规格及成分</b></p> | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 60%;">成分</th> <th style="width: 40%;">编号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>190504a</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>190504b</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>180701</td> </tr> <tr> <td>D</td> <td>15-36900yp</td> </tr> <tr> <td>E</td> <td>36900pc</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>15-36900sc</td> </tr> </tbody> </table>   |  |  | 成分 | 编号 | A | 190504a | B | 190504b | C | 180701 | D | 15-36900yp | E | 36900pc | 使用手册 | 15-36900sc |
| 成分                  | 编号   |  |  |    |    |   |         |   |         |   |        |   |            |   |         |      |            |
| A                   | 190504a  |  |  |    |    |   |         |   |         |   |        |   |            |   |         |      |            |
| B                   | 190504b  |  |  |    |    |   |         |   |         |   |        |   |            |   |         |      |            |
| C                   | 180701   |  |  |    |    |   |         |   |         |   |        |   |            |   |         |      |            |
| D                   | 15-36900yp   |  |  |    |    |   |         |   |         |   |        |   |            |   |         |      |            |
| E                   | 36900pc  |  |  |    |    |   |         |   |         |   |        |   |            |   |         |      |            |
| 使用手册                | 15-36900sc   |  |  |    |    |   |         |   |         |   |        |   |            |   |         |      |            |
| <p><b>运输及保存</b></p> | <p>低温运输，-20<math>^{\circ}</math>C 保存，保存期限为 12 个月。</p>  |  |  |    |    |   |         |   |         |   |        |   |            |   |         |      |            |
| <p><b>自备试剂</b></p>  | <p>样品 RNA，超纯水。</p>   |  |  |    |    |   |         |   |         |   |        |   |            |   |         |      |            |

## 使用方法

**一、稀释标准曲线样品**（以  $10E1-10E6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  荧光 RT-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  $\mu\text{L}$   $1 \times 10E7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10E5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  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 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

### 二、样品 RNA 的制备

7. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的是 PC (样品制备阳性对照) 和 NC (样品制备阴性对照)。可以取阳性对照的 1000 倍稀释液 10 $\mu\text{L}$  再加上一定量的水，使总体积与待提取样品的规定体积一致，以此作为 PC。另外用水作为 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。也可以选购本公司的柱式病毒 RNAout 或免提取核酸释放剂。

### 三、Probe qRT-PCR 反应 (20 $\mu\text{L}$ 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 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照(用水做模板)，6 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 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照(用水做模板)，1 个用于 RT-PCR 阳性对照(用第 4 号管的阳性对照稀释液做模板)。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最后加)：

| 成分/每管                       | 样品管<br>N+2 个 | RT-PCR<br>阴性对照 | 标准曲线样品管<br>(1-6 管)                         |
|-----------------------------|--------------|----------------|--|
| A                           | 10 $\mu$ L   | 10 $\mu$ L     | 10 $\mu$ L                                 |
| B                           | 2 $\mu$ L    | 2 $\mu$ L      | 2 $\mu$ L                                  |
| D                           | 3 $\mu$ L    | 3 $\mu$ L      | 3 $\mu$ L                                  |
| N+2 个待测 RNA 样本              | 5 $\mu$ L    | 不加             | 不加   |
| 自备超纯水                       | 不加           | 5 $\mu$ L      | 不加   |
| 第 6 步所得标准曲线样品稀释液<br>(1-6 号) | 不加           | 不加             | 5 $\mu$ L (1 号样到 1<br>号管,2 号样到 2<br>号管...) |

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 | 20 min                  |
| 预变性                   | 95 $^{\circ}$ C | 10 min                  |
| RT-PCR 反应<br>(45 个循环) | 95 $^{\circ}$ C | 15 sec                  |
|                       | 57 $^{\circ}$ C | 30 sec                  |
|                       | 72 $^{\circ}$ C | 30 sec (采集 FAM 通道的荧光信号) |

### 五、数据处理

12. 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。
13. 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 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于或等于 36。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性，如果小于或等于 36 则为阳性。如果在 36-40 之间，则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性，如果小于 40，则为阳性。

### 关联产品

中东呼吸综合征冠状病毒染料法荧光定量 RT-PCR 试剂盒