

埃博拉病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒

Ebola Virus Probe qRT-PCR Kit

目录号: [ml104834](#)

使 用 说 明 书

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/μL。
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 20μL 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	50μL	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	1.5 mL 蓝盖管
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(1×10E7 拷贝/μL)	50μL	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 165uL 的超纯水充分混匀		

后再使用，未用完的需要-20℃保存。

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以 $10E1$ - $10E6$ 拷贝/ μ 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 μ L 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 5 μ L $1 \times 10E7$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E6$ 拷贝/ μ 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 μ L $1 \times 10E6$ 拷贝/ μ 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/ μ 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 μ L $1 \times 10E5$ 拷贝/ μ 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/ μ 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 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，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 10 μ L 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	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	各 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 (2-6 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 (40 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15sec
	60 $^{\circ}$ C	60sec (采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 BHQ1)

四、数据处理

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。 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。 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。 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。
自备试剂	样品 RNA，超纯水。
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。