

## 马尔堡病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒

## Marburg Virus Probe qRT-PCR Kit

CAT#: BN63650

低温运输, -20℃保存

## 产品及特点

马尔堡病毒 (Marburg Virus) 是以西德城市马尔堡而命名, 又称绿猴病病毒和马堡病毒等, 是一种致命性病毒, 引起马尔堡出血热。该病毒和埃博拉病毒有关, 也源自非洲乌干达及肯尼亚一带, 可以感染人类和其他灵长类。病毒是由动物传染给人类, 但病毒始终来源不明。马尔堡病毒可以透过体液, 包括血液、排泄物、唾液及呕吐物传播。病患者病状为发高烧, 腹泻、呕吐, 身体各孔穴严重出血。通常病发后一周死亡。病发死亡率为 25%~100%。由于这种具高度传染能力, 而同时致命的疾病, 没有任何疫苗或医治的方法, 因此快速灵敏诊断马尔堡病毒具有重要意义。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马尔堡病毒的试剂盒, 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/μL。
3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。
4. 特异性高, 引物是根据马尔堡病毒 RNA 高度保守区设计, 不会跟其他生物的 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 各数量级。
6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。
7. 本产品只能用于科研。

<b>规格及成分</b>	<table border="1" data-bbox="424 273 1401 723"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>规格</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>探针法 qRT-PCR 缓冲液</td> <td>60001</td> <td>500 <math>\mu</math> L</td> </tr> <tr> <td>探针法 qRT-PCR 酶混合液</td> <td>60002</td> <td>100 <math>\mu</math> L</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>60003</td> <td>1 mL</td> </tr> <tr> <td>马尔堡病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液</td> <td>63650-4</td> <td>150 <math>\mu</math> L</td> </tr> <tr> <td>马尔堡病毒 RT-PCR 阳性对照 (1<math>\times</math>10<sup>7</sup> 拷贝/<math>\mu</math> L)</td> <td>63650-5</td> <td>50 <math>\mu</math> L</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td></td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>	成分	编号	规格	探针法 qRT-PCR 缓冲液	60001	500 $\mu$ L	探针法 qRT-PCR 酶混合液	60002	100 $\mu$ L	荧光 PCR 专用模板稀释液	60003	1 mL	马尔堡病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	63650-4	150 $\mu$ L	马尔堡病毒 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10 <sup>7</sup> 拷贝/ $\mu$ L)	63650-5	50 $\mu$ L	使用手册		1 份
成分	编号	规格																				
探针法 qRT-PCR 缓冲液	60001	500 $\mu$ L																				
探针法 qRT-PCR 酶混合液	60002	100 $\mu$ L																				
荧光 PCR 专用模板稀释液	60003	1 mL																				
马尔堡病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	63650-4	150 $\mu$ L																				
马尔堡病毒 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10 <sup>7</sup> 拷贝/ $\mu$ L)	63650-5	50 $\mu$ L																				
使用手册		1 份																				
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20℃ 保存，保存期限为 12 个月。																					
<b>自备试剂</b>	样品 RNA。																					
<b>使用方法</b>	<p>一、<b>稀释标准曲线样品</b>（以 10E1-10E6 拷贝/<math>\mu</math> 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。如果需要 RNA 阳性样品，需要另外订购。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 标记 6 个离心管，分别为 6，5，4，3，2，1。</li> <li>2. 用带芯枪头分别加入 45 <math>\mu</math> L 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。</li> <li>3. 在 6 号管中加入 5 <math>\mu</math> L 1<math>\times</math>10<sup>7</sup> 拷贝/<math>\mu</math> L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1<math>\times</math>10<sup>6</sup> 拷贝/<math>\mu</math> L 的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 <math>\mu</math> L 1<math>\times</math>10<sup>6</sup> 拷贝/<math>\mu</math> L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1<math>\times</math>10<sup>5</sup> 拷贝/<math>\mu</math> L 的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 <math>\mu</math> L 1<math>\times</math>10<sup>5</sup> 拷贝/<math>\mu</math> L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1<math>\times</math>10<sup>4</sup> 拷贝/<math>\mu</math> L 的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>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。</li> </ol> <p>二、<b>样品 RNA 的制备</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>7. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 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 10 <math>\mu</math> L 上步所得 4 号稀释液</li> </ol>																					

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 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 RNA 提取试剂盒兼容，也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

### 三、Probe qRT-PCR 反应（20 $\mu$ 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（直接用第 6 步第 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	样品管 N+2 个	RT-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 $\mu$ L	10 $\mu$ L	各 10 $\mu$ L
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	各 2 $\mu$ L
马尔堡病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	各 3 $\mu$ L	3 $\mu$ L	各 3 $\mu$ L
N+2 个待测 RNA 样本	各 5 $\mu$ L	不加	不加
超纯水	不加	5 $\mu$ 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 $\mu$ L（2 号样到 2 号管，3 号样到 3 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°C	30 min
预变性	95°C	5 min
PCR 反应 (40 个循环)	95°C	15 sec
	60°C	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 TAMRA)

#### 四、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 35。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 35 则为阳性。如果在 35-40 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

马尔堡病毒荧光及可视化 RT-LAMP 检测试剂盒