

超敏三重新冠巢式荧光 RT-PCR 检测盒

(TaqMan One-Step Nested RT-PCR 法)

货号: A227020 规格: 100T x 25 µl 保存: -20°C



组分:

名 称	100T
2.5xOne-Step Nested PCR Buffer Mix	1 ml
SD 3.0 DNA/RNA Polymerase	100 µl
Nested nCoV-N3 Oligo Mix	900 µl
N 基因阳性标准品 (10e4 copy /µl)	100 µl

保存条件: 试剂保存到-20°C以下, 可保存 12 个月。

注意: 尽管该试剂盒性能出众, 但该试剂盒仅供科学研究使用, 该试剂盒未经临床样本测试, 也未获得医药注册许可。

性能说明:

1. 以体外转录 RNA 为模板, 可检测到 5copy/test (100% 检出)。
2. 人内参 GAPDH 基因检测到 0.05ng Total RNA 水平。
3. 阴性样本在 40Ct 以内无起峰。
4. 标准定量 PCR 仪运行时间约 60min。
5. 针对 N 基因的两个目标区域覆盖探针, 防止突变造成的假阴性。N 基因区段 1 为 FAM 通道; N 基因区段 2 为 HEX 通道; 内参 GAPDH (ROX 通道)。
6. 靶标序列: (方框标示两条探针覆盖区)
AACTGTCACCTAAGAAATCTGCTGCTGAGGCTTCTAA
GAAGCCTCGGCAAAAACGTACTGCCACTAAAGCATA
CAATGTAACACAAGCTTTCGGCAGACGTGGTCCAGA
ACAAACCCAAGGAAATTTTGGGGACCAGGAAGTAAT
CAGACAAGGAAGTATTACAAACATTGGCCGCAAAT
TGCACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAGCGTTCTTCGGA
ATG

使用方法:

1. 按照如下组分配制 PCR 反应体系:
每次检测反应, 阴性对照一孔 (5 µl ddH₂O), 阳性对照一孔 (5 µl N 基因阳性标准品)。

2.5xOne-Step Nested PCR Buffer Mix	10 µl
Nested nCoV-N3 Oligo Mix	9 µl
*SD 3.0 DNA/RNA Polymerase	1 µl
检测核酸模板	5 µl
总体积	25 µl

注意: SD 3.0 DNA/RNA Polymerase 含有高浓度的甘油, 比较粘稠, 请小心吸取。

2. 在定量 PCR 上设置 FAM、HEX 和 ROX 通道收集信号

55°C	5 min	逆转录
*90°C	5 min	热启动
*90°C	10 s	循环 40 次
60°C	30 s(收集信号)	

注意: SD 酶的变性温度为 90°C, 其它温度条件都会导致试剂性能下降。请反复核实, 该参数是否设置正确。

3. 结果判读

3.1 实验成立的条件

- (1) 阳性标准品 FAM 和 HEX 通道扩增正常, 通常 Ct=24-28。阴性 ddH₂O 不起峰。在此条件下待检测其它样品判读有效。
- (2) 阳性标准品 FAM 或 HEX 通道不起峰, 表明 PCR 程序设置错误, 或试剂失效, 需重新检测。
- (3) 阴性 ddH₂O FAM 或 HEX 通道起峰, 表明发生污染, 需重新检测。

3.2 待检样本判读

FAM (N1)	HEX (N2)	ROX 内参	结果判读
Ct<35	Ct<35	不 参 考	阳性
无 Ct	无 Ct	有 Ct	阴性
Ct=35-40	Ct=35-40	不 参 考	复检一次, 仍然在此区间, 判读为阳性, 否则判读为阴性。通常此区间表明病毒含量 <5copy。
无 Ct	Ct<35	不 参 考	检查程序设置, 并复检。复检结果仍然如此, 判读为阳性, 并考虑是否发生变异。
Ct<35	无 Ct	不 参 考	
无 Ct	无 Ct	无 Ct	(1)检测样本来自其它材料的情况下, 比如食品、外包装、器皿、器械, 则判读为阴性。 (2)检测样本来源于人体, 则可能存在投入反应体系的核酸量太少。或核酸样本中存在强 PCR 抑制物。本试剂最低人 RNA 的检出量为 0.05ng。