



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
 订货热线: 400-1683301 或 800-8283301  
 订货 e-mail: order@beyotime.com  
 技术咨询: info@beyotime.com  
 网址: http://www.beyotime.com

## 新型冠状病毒(2019-nCoV)双荧光qRT-PCR试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D8006S	新型冠状病毒(2019-nCoV)双荧光qRT-PCR试剂盒	100次
D8006M	新型冠状病毒(2019-nCoV)双荧光qRT-PCR试剂盒	500次

### 产品简介:

- 碧云天生产的新型冠状病毒(2019-nCoV)双荧光qRT-PCR试剂盒, 即Novel Coronavirus (2019-nCoV) Dual Probes qRT-PCR Kit, 是基于ORF1ab基因和N基因的双荧光探针的用于新型冠状病毒(2019-nCoV/SARS-CoV-2)核酸检测的试剂盒。本试剂盒经过假病毒验证, 可以免RNA抽提而直接用于RNA病毒样品的检测, 使用非常便捷。
- 2019年底由新型冠状病毒引起的肺炎疫情, 从2020年初开始在全球大流行, 感染病例快速上升, 引发全球关注。该病毒被世界卫生组织(WHO)命名为2019-nCoV, 被国际病毒分类委员会命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)。由新型冠状病毒导致的疾病, 被世界卫生组织正式命名为冠状病毒疾病2019 (Corona Virus Disease 2019, COVID-19), 通常称为新型冠状病毒肺炎, 简称‘新冠肺炎’。
- 冠状病毒是一个大型病毒家族, 已知可引起感冒以及中东呼吸综合征(MERS)、严重急性呼吸综合征(SARS)等较严重疾病以及新冠肺炎COVID-19。新型冠状病毒是以前从未在人体中发现的冠状病毒新毒株。
- 本试剂盒以新型冠状病毒ORF1ab基因和N基因中的保守区为靶点, 参考中国疾病预防控制中心提供的新型冠状病毒核酸检测引物和探针序列, 并经过优化而研发的新型冠状病毒核酸检测试剂盒。每条检测探针的5'端标记FAM或VIC荧光基团, 3'端标记TAMRA或BHQ1淬灭基团。扩增之前探针上的淬灭基团由于空间上的荧光共振能力转移(FRET)而导致荧光基团淬灭。PCR反应时, 引物和探针都会退火到目标基因上, 随着引物的延伸, Taq酶的5'→3'外切酶活性会导致结合在目标基因上的探针从5'端开始逐渐被降解。探针的荧光基团和淬灭基团被Taq酶切开后, 淬灭基团的作用消失, 荧光基团就能正常地被激发光所激发而产生荧光。每经过一个PCR循环, 就会有更多的荧光基团被释放, 荧光强度与新合成的目标片段数量成正比, 荧光定量PCR仪可根据检测到的荧光信号绘制出实时扩增曲线, 从而实现对新冠状病毒(2019-nCoV)在核酸水平上的检测。
- 本试剂盒包含了BeyoRT™ M-MLV反转录酶、BeyoFast™ Taq DNA Polymerase、引物、探针、PCR Buffer、dNTPs、稳定剂、Nuclease-free Water和镁离子等所有的通用组分, 操作更简单、使用便捷, 用户只需自备样品RNA即可。本试剂盒的检测下限为500-1000 copies/ml。本试剂盒用于阳性质粒检测的平均Ct值见下表, 检测效果参考图1。

Target	100pg	10pg	1pg	0.1pg	0.01pg	0pg
N-FAM	13.28	16.73	20.02	23.36	26.85	Undetermined
ORF1ab-VIC	13.12	16.41	19.82	23.17	26.73	Undetermined

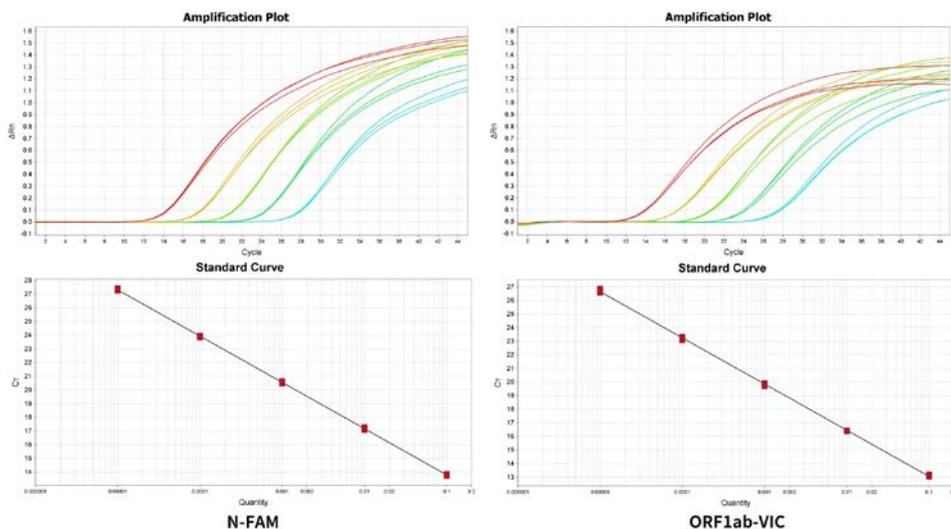


图1. 新型冠状病毒(2019-nCoV)双荧光qRT-PCR试剂盒用于阳性质粒的检测效果图。将阳性质粒稀释至每反应中的每个质粒质量分别为100、10、1、0.1、0.01pg, 然后用本试剂盒进行双荧光qRT-PCR检测。由于阳性质粒是超螺旋的, 其检测灵敏度远低于线性化的质粒, 不能直接用超螺旋质粒的检测灵敏度去计算检测下限。实测数据可能会因样品、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 本试剂盒适用于具有FAM和VIC/HEX/JOE检测通道的荧光定量PCR仪, 如ABI的7500、7900、StepOne、QuantStudio系列,

Roche的LightCycler480、SmartCycler, Bio-Rad的CFX96、Chromo4、Opticon 2、iCycler IQ、iQ5, Qiagen的Rotor Gene 6000, 上海宏石SLAN-96P等。

- **本试剂盒经假病毒验证, 可以免RNA抽提而直接用于病毒的核酸检测。**本试剂盒经过优化, 对含咽拭子、唾液的常规病毒保存液有较好的兼容性; 同时, 本试剂盒经假病毒模拟咽拭子、唾液样品验证, 可以适用于保存于病毒保存液中的RNA病毒样品的直接检测, 无须进行RNA的抽提, 使用非常便捷, 相关结果参考下表。不同数量的新冠病毒N基因慢病毒保存在含咽拭子的TE溶液中, RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式) (R0035S/M/L)提取病毒后或未经抽提直接使用本试剂盒进行qRT-PCR检测。此处的病毒量是指每个PCR反应体系中病毒的IU (Infection Unit)数。注: 实际操作时, 须根据病毒样本的来源、保存液类型进行一定的验证测试。IU数为具有生物活性的病毒颗粒数, 实际病毒的拷贝数可能是IU数的10-1000倍。

样本处理方式		病毒RNA抽提试剂盒提取			直接法		
病毒量(IU)		400	40	4	400	40	4
Ct值	复孔1	24.58	27.93	32.19	25.39	28.97	32.04
	复孔2	25.07	28.27	31.58	25.12	28.68	31.00
	复孔3	25.21	28.05	31.73	25.13	28.90	31.31
	平均值	24.95	28.09	31.84	25.21	28.85	31.45

- 如果用于常规的96孔板qRT-PCR检测(建议反应体系为25μl), 本产品小包装D8006S可以进行100次检测, 中包装D8006M可进行500次检测; 如果用于常规的384孔板qRT-PCR检测(建议反应体系为10μl), 本产品小包装D8006S可以进行250次检测, 中包装D8006M可进行1250次检测。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D8006S-1	Enzyme Mix	250μl
D8006S-2	Reaction Buffer	2ml
D8006S-3	Novel CoV (2019-nCoV) Negative control	200μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D8006M-1	Enzyme Mix	1.25ml
D8006M-2	Reaction Buffer	10ml
D8006M-3	Novel CoV (2019-nCoV) Negative control	1ml
—	说明书	1份

### 保存条件:

-20°C避光保存, 一年有效。尽量避免反复冻融。

### 注意事项:

- **本试剂盒并非临床诊断检测试剂盒, 检测结果仅供科学研究用途, 不得作为临床诊断的依据。**但感兴趣的用户可以与碧云天合作, 使用本试剂盒作为原料, 研发和申报相应的临床诊断检测试剂盒。
- **为避免阳性对照污染造成新冠病毒核酸检测的假阳性, 根据相关的管控要求, 2021年12月起本试剂盒不再包含阳性对照。如需阳性对照, 请自备。**
- 样本的采集、保存及运输条件等都可能影响检测结果, 其中任何环节失误或污染都会导致假阴性或假阳性结果。
- 本试剂盒检测的靶序列为新型冠状病毒(2019-nCoV) ORF1ab基因和N基因的保守区域。但如果病毒在靶序列处发生基因突变, 则可能出现假阴性结果。
- 样本灭活(如56°C、45分钟)很可能会使检测结果的Ct值增加1-2。
- Enzyme Mix含有高浓度甘油, 粘度高, 使用前须将所有液体短暂离心至管底, 然后缓慢准确吸取。
- 使用前须确保Reaction Buffer完全融化, 并且上下颠倒混匀至少3次后使用。
- 经测试, 本产品反复冻融10次对使用效果无显著影响。但仍需尽量避免反复冻融本产品, 反复冻融可能使产品性能下降。
- qPCR检测是超高灵敏度的检测, 尽量在标准的PCR实验室中进行检测。PCR反应设置区域须尽量避免各种可能的扩增产物的污染。请勿撕开PCR封板膜或PCR管盖, PCR产物宜密封后按扩增后产物要求处理, 以避免超高浓度的PCR产物污染实验环境。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明:

#### 1. 需要用户自己准备的耗材、仪器和试剂

- 具有FAM和VIC荧光通道的荧光定量PCR仪。
- DNase-free、RNase-free的吸头、离心管、荧光定量PCR用96孔板或384孔板、PCR板封板膜。
- 生物安全柜。

d. RNA提取试剂盒。推荐使用碧云天生产的RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式) (R0035S/M/L)。

## 2. 样本准备

- 本试剂盒适用样本类型：上呼吸道标本(包括咽拭子、鼻拭子、鼻咽抽取物、深咳痰液)；下呼吸道标本(包括呼吸道抽取物、支气管灌洗液、肺泡灌洗液、肺组织活检标本)；组织培养物等样本。
- 样本采集具体方法请参考‘2019新型冠状病毒核酸检测专家共识’和‘新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南’。
- 样本采集后，可保存在病毒样品常规保存液(R0143)进行病毒的保存，并须当日完成检测。否则按下述方案保存：2~8℃保存，不超过24小时；-20℃保存，不超过3个月；-70℃以下可长期保存，但应避免反复冻融。也可以使用碧云天的RNALater™病毒RNA稳定保存液(R0141)进行保存，室温可以保存7天左右。
- 将样品按照病毒RNA提取试剂盒中相应的要求和步骤进行RNA提取，提取的RNA可直接用于检测。若提取后不立即检测，也可保存于-70℃备用，同时应尽量避免反复冻融。
- 经假病毒模拟验证，本试剂盒也适用于保存于常规病毒保存液中的咽拭子、唾液等样品的直接检测，无须进行RNA的抽提。但实际操作时，须根据病毒样本的来源、保存液类型进行一定的对比测试。对于保存在RNALater™病毒RNA稳定保存液(R0141)的样品，必须进行RNA抽提后才能使用本试剂盒进行检测。不同数量的新冠病毒N基因慢病毒保存在含咽拭子的各种病毒保存液(TE、PBS及含FBS和抗生素的HBSS)、细胞培养液(DMEM、1640，不含FBS)、碧云天的BeyoDirect™ RNA病毒直接qRT-PCR保存液中，未经抽提直接使用本试剂盒进行qRT-PCR检测的效果见下表。此处的病毒量为每个PCR反应体系中病毒的IU数。从下表数据可以看出，TE、PBS及常用的细胞培养液中保存的假病毒可以直接用于本试剂盒检测，而碧云天的BeyoDirect™ RNA病毒直接qRT-PCR保存液(R0145)效果更佳。含有FBS的HBSS可能由于FBS的影响，Ct值会高出约2-3。

病毒保存液	TE				PBS				HBSS + 2% FBS + 1% PS			
病毒量(IU)	400	200	100	50	400	200	100	50	400	200	100	50
Ct平均值	25.46	26.43	27.73	28.44	25.51	26.40	27.50	28.42	27.58	28.57	29.38	30.38
标准偏差	0.096	0.157	0.420	0.122	0.069	0.015	0.081	0.259	0.156	0.054	0.040	0.174

病毒保存液	DMEM				1640				BeyoDirect™ RNA病毒直接qRT-PCR保存液			
病毒量(IU)	400	200	100	50	400	200	100	50	400	200	100	50
Ct平均值	24.99	25.86	26.76	28.37	25.38	25.98	27.19	28.00	24.23	25.25	26.73	27.75
标准偏差	0.035	0.187	0.562	0.090	0.100	0.277	0.203	0.084	0.118	0.180	0.129	0.232

f. 核酸扩增的各个步骤需要在指定区域进行，以避免交叉污染。例如样本处理、加样在样本处理区，扩增试剂准备在PCR前准备区，核酸扩增在检测区。

## 3. qRT-PCR反应体系的设置

- 融解并混匀反应所需的各种溶液，置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在室温或冰浴上设置qRT-PCR反应体系(以96孔板，每孔反应体系为25μl为例)。下表中的Template RNA为样品RNA、试剂盒中提供的Negative Control或需自备的Positive Control。建议每次检测都设置阴性对照(Negative control)和阳性对照(Positive control)。

Reagent	Volume
Reaction Buffer	17.5μl
Enzyme Mix	2.5μl
Template RNA*	5μl
<b>Total Volume</b>	<b>25μl</b>

\*注：实际操作时，如果经验证测试可免RNA抽提而直接检测，则用RNA病毒样本直接替代Template RNA。

- 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底。
- 将设置好的PCR反应管或PCR反应板置于荧光定量PCR仪上，开始PCR反应。
- 荧光检测通道的选择：ORF1ab基因荧光基团是VIC，可选择检测通道(Reporter)为VIC/HEX/JOE，淬灭基团(Quencher)是BHQ1，如果没有BHQ1，则选择无；N基因荧光基团是FAM，可选择检测通道为FAM，淬灭基团是TAMRA，如果没有TAMRA，则选择无。请将仪器的荧光内参设置为‘None’，例如：对于ABI系列仪器，将‘Passive Reference’设置为‘None’。

## 4. qRT-PCR反应程序

本试剂盒建议采用如下的qRT-PCR程序，本程序是以ABI QuantStudio™ 6 Flex荧光定量PCR仪为例：

- 反转录：50℃ 20min
- 预变性：95℃ 2min
- 变性：95℃ 15sec
- 退火/延伸：60℃ 20sec
- 重复步骤c和步骤d，总共45个循环
- 最后使用荧光定量PCR仪提供的软件分析检测结果。

## 5. 结果的定性判断

- 阳性对照(需自备)：呈典型S型扩增曲线且Ct值≤33。

- b. 阴性对照：无典型S型扩增曲线或Ct值>38。
- c. 阳性：如果待测样本检测结果VIC通道和FAM通道均Ct值≤35，则可判断为新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸阳性。
- d. 阴性：如果两个通道检测Ct值无数值或Ct值>38，且阳性对照品检测结果为阳性，此次结果判断为新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸阴性，但不排除其它冠状病毒感染的可能。
- e. 可疑：如果待测样本35<Ct值≤38，则此样本应重新提取核酸后再次进行检测。如重复检测结果显示两个通道Ct值均≤35，则判断为新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸阳性；如两个通道检测Ct值无数值或Ct值>38，则判断为新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸阴性；如其中任一通道35<Ct值≤38，则该样本为可疑样本，应通过其它方法如测序进行进一步的分析和检测。

**相关产品：**

产品编号	产品名称	包装
D8006S	新型冠状病毒(2019-nCoV)双荧光qRT-PCR试剂盒	100次
D8006M	新型冠状病毒(2019-nCoV)双荧光qRT-PCR试剂盒	500次
R0035S	RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式)	12次
R0035M	RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式)	50次
R0035L	RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式)	200次
R0123	RNase and DNase Away	250ml
R0125	RNase, DNase and DNA Away	250ml
R0127	RNase, DNase, RNA and DNA Away	250ml
R0141-100ml	RNALater™病毒RNA稳定保存液	100ml
R0141-500ml	RNALater™病毒RNA稳定保存液	500ml
R0143-100ml	病毒样品常规保存液	100ml
R0145-100ml	BeyoDirect™ RNA病毒直接qRT-PCR保存液	100ml
FSF002	荧光定量PCR用封板膜(ABI分装)	10片
FTUB333	荧光定量PCR用96孔板(ABI原装)	10个
FTUB384	荧光定量PCR用384孔板(ABI分装)	10个

Version 2021.12.07