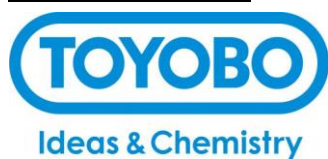


科研用试剂



20-09



# 新型冠状病毒核酸检测试剂盒（多重） (SARS-CoV-2 Detection Kit –Multi-)

Code No. NCV-403

中文说明书

TOYOBO CO., LTD. Biotech support Department  
OSAKA JAPAN

## - 目录 -

[1] 前言 .....	- 2 -
[2] 产品组成 .....	- 2 -
[3] 保存温度 .....	- 3 -
[4] 其他必需品 .....	- 4 -
[5] 实验前 .....	- 5 -
[6] 操作步骤 .....	- 6 -
1) 预处理 .....	- 6 -
2) 阳性对照、阴性对照的准备 .....	- 7 -
3) RT-PCR 反应液的制备、添加 .....	- 7 -
4) RT-PCR 循环条件 .....	- 8 -
[7] 判定例 .....	- 8 -
[8] 实验例 .....	- 9 -
[9] 问题对策 .....	- 10 -

## - 注意事项 -

本产品为科研用试剂。请勿作为诊断、临床试剂使用。本产品非临床诊断试剂。在使用时，请严格遵守实验室的一般注意事项，安全操作。

本产品所含的前处理液中含有蛋白质分解酶。请戴好保护用具（护目镜、口罩、保护手套等）、避免吸入。

试剂及使用过的器具，请将其按照含有传染性的物品的各设施的安全规定进行使用或废弃处理。

使用含有病毒不活化组分的检测样本采样容器时，有可能不活化组分会抑制 PCR 反应。对于添加了所使用的样品采集容器中含有的溶液的反应液，请事先进行阳性对照 RNA 的 spike 试验，确认检测灵敏度。

## [1] 前言

本产品是可对唾液、鼻咽拭子采样液、病毒培养液等材料，进行新型冠状病毒（SARS-CoV-2）检测用的荧光定量 1-step RT-PCR 试剂盒。将样本与预处理液混合后，通过热处理、RT-PCR 反应，无需进行 RNA 抽提纯化操作，即可检测病毒 RNA。

使用本产品可同时检测 SARS-CoV-2 RNA 的 N 基因来源的 2 个区域。而且，为了降低因 PCR 检测不良产生的假阴性，还含有内参对照。

### ◆本产品的特征◆

- 无核酸提纯步骤，使用简便。
- 从逆转录反应到 PCR 只要一步即可。反应中间无需添加试剂，可迅速进行测定。
- 使用荧光探针的 Realtime PCR 检测，无需进行电泳。
- 为防止 carryover 导致的污染，使用 Uracil-DNA Glycosylase (UNG) 预分解扩增产物。
- 为降低假阴性，含有内参对照。

## [2] 产品组成

本产品含有以下组分，可进行 100 次检测。

注：不含阳性对照品。请参照「[4] 其他必需品」(p.4)。

试剂名称	体积
① 预处理液	660 μL
② 反应液	1,100 μL×3
③ 酶液	550 μL
④ 引物·探针溶液	550 μL

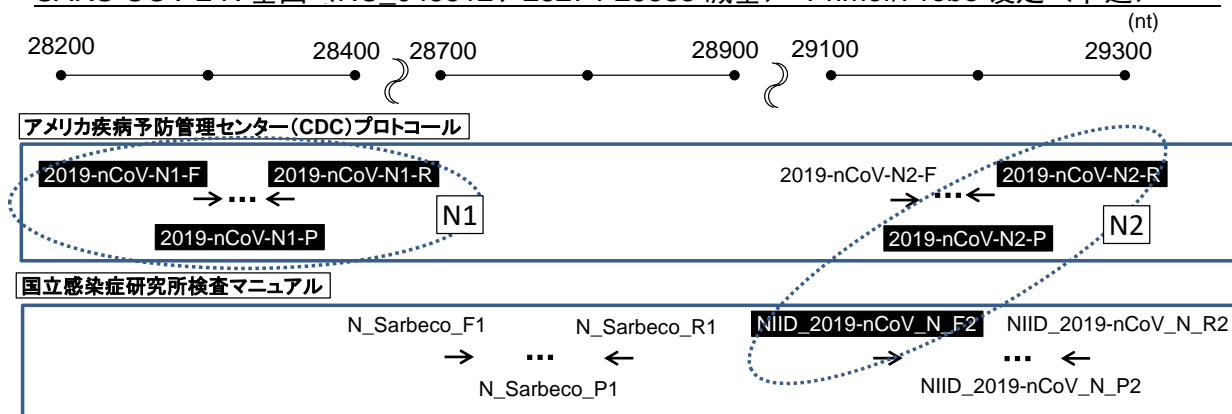
- 引物、探针溶液

根据美国疾病预防控制中心（CDC）发行的「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes」(Effective: 24 Jan 2020)、国立传染病研究所发行的「病原体检测手册 2019-nCoV Ver.2.9.1」(2020 年 3 月 19 日发行) 设定的序列，采用以下序列（下图的**黑底白字**）。

N1 区域用 Cy5、N2 区域用 ROX、内参对照用 FAM 通道进行检测。

		Name	Sequence (5' to 3')
N1	引物	2019-nCoV_N1-F	GACCCCAAAATCAGCGAAAT
		2019-nCoV_N1-R	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG
	探针	2019-nCoV_N1-P	ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC
N2	引物	NIID_2019-nCoV_N_F2	AAATTTTGGGGACCAGGAAC
		2019-nCoV_N2-R	GCGCGACATTCCGAAGAA
	探针	2019-nCoV_N2-P	ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG

SARS-COV-2 N 基因 (NC\_045512、28274-29533 碱基) Primer/Probe 设定 (节选)



### [3] 保存温度

本产品中所含试剂应全部在-20℃保存。

## [4] 其他必需品

- Realtime PCR 仪器（具有 FAM、ROX、Cy5 通道）
- Vortex Mixer
- 移液器等
- 枪头、离心管等耗材
- Spin down 用离心机
- 阳性对照

可使用 SARS-CoV-2 抽提的 RNA、含有 N 基因的合成 RNA、及其他标准物质。以下的市售产品，使用本试剂盒，已确认可作阳性对照而使用。

### ① RNA

- i) EDX SARS-CoV-2 Standard (Exact Diagnostics, Code. COV019) (Bio-Rad 公司)
- ii) AMPLIRUN SARS-CoV-2 RNA CONTROL (Vircell, Code.MBC137-R)
- iii) AcroMetrix Coronavirus 2019(COVID-19) RNA Control (Thermo scientific, Code. 954519)
- iv) Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control1 (MT007544.1) (Twist Bioscience, Code. 102019)

### ② 阳性标准物质

- i) NATtrol SARS-CoV-2 (recombinant) Stock (ZeptoMetrix, Code. 0831042)
- ii) AccuPlex SARS-CoV-2 Reference Material Kit (SeraCare, Code.0505-0126)

- Nuclease-free 级别的灭菌蒸馏水

可作为阴性对照或阳性对照的稀释液使用。为防止 carryover 导致污染，请分装成小份进行使用。

例如) UltraPure Distilled Water (DNase/RNase Free) (ThermoFisher、Code. 10977-015)  
灭菌水 (Nacalai Tesque、Code. 06442-95)

## [5] 实验前

- (1) 试验材料的采样及保存, 请参照「2019-nCoV (新型冠状病毒) 感染疑似患者的检测样本采样·运输手册」(国立传染病研究所) 最新版本。
- (2) Spike 试验
  - 使用含有胍等不活化成分的检测样本取样容器时, 有时不活化成分会抑制 PCR 反应。另外, 作为实验对象的检测样品不同也可能会影响检测。对于使用的试验材料, 请事先进行阳性对照的 Spike 试验, 确认检测灵敏度。
  - 使用作为 spike 试验的阳性对照 RNA 时、如果向预处理前的试验材料中直接添加 RNA, 则 RNA 会被分解掉。进行 RNA 的 spike 试验时, 请预先将预处理液与试验样本混合后进行热处理, 然后向预处理之后的样本中添加 RNA。
  - 使用作为 spike 试验的阳性对照病毒样阳性标准物时、RNA 不会被分解掉, 所以可直接向未处理的试验样本中添加阳性标准物质并进行试验即可。
- (3) 阳性对照、阴性对照
  - 每个实验, 请设置阳性对照、阴性对照各 1 个孔以上。请参照「[6] 操作步骤·(2) 阳性对照、阴性对照的准备」(p.7)。
- (4) 本试剂中, 为保持检测效率, 设计了能检测 SARS-CoV-2 病毒基因组内的 2 个区域, 但是引物、探针的序列内产生突变时, 有可能检测不到。
- (5) 污染对策
  - 本试剂中, 通过使用 UTP/UNG 来分解扩增产物进行防污染, 通过对试剂制备、试验材料制备及 PCR 扩增进行分区操作, 能够进一步防止污染。
- (6) 试验材料及所使用的器具, 请归为传染性的物品, 根据各设施的安全规定进行使用及废弃处理。
- (7) 本试剂使用后, 请迅速放置于-20°C 保存。

## [6] 操作步骤

### 1) 预处理

- 检测提纯的 RNA 时，无需进行预处理。向 Realtime PCR 反应管中每次取 10  $\mu$ L 进行反应，「(2) 阴性对照、阳性对照的准备」之后、 请进行「(3)RT-PCR 反应液的制备、添加」。
- 请在即将使用「①预处理液」之前进行解冻，用 Vortex Mixer 进行充分混匀。接着，请先 Spin down 离心，再打开离心管的盖子。

① 在 PCR 管中制备以下量的试剂，室温放置 5 分钟左右。

- 制备时，请确认「①预处理液」完全落到 PCR 管的底部，并将试验样本添加到 PCR 管的底部。
- 试验样本是唾液时，请根据传染病研究所的「2019-nCoV（新型冠状病毒）感染疑似患者的检测样本采样·运输手册」进行采样。粘性较高时，请添加唾液体积 1~3 倍量的 PBS，通过 Vortex Mixer 并剧烈颠倒混匀，使用离心后的上清进行实验。
- 对于像唾液这样粘性较高的试验样本，请先将试验材料用 Suptazyme（极东制药工业）等的痰溶解酶处理以后，再使用以下预处理液进行处理，或进行 RNA 的纯化。DTT 处理会对 Realtime PCR 检测有影响，请勿进行此处理。

	1 个反应相当的量
① 预处理液	3 $\mu$ L
试验样本（或者添加了阳性、阴性标准物质的试验样本等）	8 $\mu$ L
合计	11 $\mu$ L

\* 将预处理液 6  $\mu$ L、试验样本 16 $\mu$ L 混合，该处理液的 11 $\mu$ L 可用于下一步的 PCR 中。

- ② 95 $^{\circ}$ C、5 分钟加热后，立刻进行以下步骤。预处理完的试验样本在进行下一步反应前需要短时间保存时，请放置于冰上或 4 $^{\circ}$ C 保存。
- 为了将预处理液中的蛋白质分解酶失活，请务必进行热处理。
  - 预处理后的溶液不能保存。
  - RNA 的 Spike 试验中，向加热处理后的上述试验样本中添加 1  $\mu$ L RNA 后再使用。

## 2) 阳性对照、阴性对照的准备

- 结果判定时，为确认检测是否正确，要进行阳性对照、阴性对照反应。

① 在 Realtime PCR 反应管中准备以下溶液。

a) 阴性对照 10  $\mu$ L 灭菌水

b) 阳性对照

1 个反应相当的量	
阳性对照 RNA	x $\mu$ L
灭菌水	10-x $\mu$ L
合计	10 $\mu$ L

- 阳性对照 RNA 按 1,000~2,000 拷贝 / 反应的标准制备。
- 稀释时请使用低吸附枪头 (siliconized 离心管等)。
- 阳性对照 RNA 的稀释品请在使用前制备，避免冻融。

## 3) RT-PCR 反应液的制备、添加

① 按照以下 1 个反应相当的量，制备所需反应数的混合液量。

- 「②反应液」、「④引物·探针液」使用前需进行解冻，使用 Vortex Mixer 充分混匀。 之后，请先 Spin down 离心，再打开离心管的盖子。

- 请将「③酶液」放置于冰上使用，或即将使用前再从-20℃取出，使用后请立刻放回-20℃。

- 将「③酶液」颠倒混匀，然后先 Spin down 离心，再打开离心管的盖子。

1 个反应相当的量	
②反应液	30 $\mu$ L
③酶液	5 $\mu$ L
④引物·探针液	5 $\mu$ L
合计	40 $\mu$ L

\* 进行多个反应时，请按反应数+10%左右的基准制备 Master Mix。

② 将 1 个反应 40  $\mu$ L 添加到(1)预处理完的试验样本、(2)阳性、阴性对照中。

③ 盖上管盖。

④ 盖上管盖后，请敲打管壁或用 Vortex Mixer 将反应液混合，Spin down 稍微离心。

⑤ 立刻按以下温度条件进行反应。



#### 4) RT-PCR 循环条件

按以下温度循环条件进行反应。

逆转录反应	42°C	5 min		
预变性	95°C	10 sec		
变性	95°C	5 sec		
延伸	60°C	30 sec	检测	×45个循环

- \* 请设定为不用 ROX 校正进行分析。
- \* 反应结束后反应液可能呈白色浑浊状，不影响检测结果。

## [7] 判定例

N1(Cy5)	N2(ROX)	IC(FAM)	判定
≤40	≤40	≤40	阳性
≤40	>40、或不能检测到	≤40	阳性
>40、或不能检测到	≤40	≤40	阳性
>40、或不能检测到	>40、或不能检测到	≤40	阴性(检测灵敏度以下)
不能检测到	不能检测到	不能检测到	不能判定

- \* 阳性对照中 Ct≤40 (使用 1,000~2,000 拷贝时 Ct≤35)的起峰不能确认时或阴性对照中确认有起峰时，应重新进行检测。
- \* 试验样本测定中 Ct>40 确认有起峰时，建议重新进行检测。

## [8] 实验例

将市售的阳性对照 RNA 进行系列稀释，用本试剂盒进行了检测。

### <N1 (Cy5 通道) Ct 值>

拷贝数	AMPLIRUN SARS-CoV-2 RNA CONTROL	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control1 (MT007544.1)	AcroMetrix Coronavirus 2019(COVID-19) RNA Control	EDX SARS-CoV-2 Standard
	Vircell	Twist Bioscience,	Thermo scientific	Exact Diagnostics
500	30.6	31.7	31.7	30.6
50	33.8	35.0	35.2	33.2
	33.6	34.7	35.1	32.5
25	34.5	35.9	35.3	34.1
	35.4	35.7	35.8	33.5
5	36.1	N/A	37.3	35.4
	35.9	37.3	36.6	36.7
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A

### <N2 (ROX 通道) Ct 值>

拷贝数	AMPLIRUN SARS-CoV-2 RNA CONTROL	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control1 (MT007544.1)	AcroMetrix Coronavirus 2019(COVID-19) RNA Control	EDX SARS-CoV-2 Standard
	Vircell	Twist Bioscience,	Thermo scientific	Exact Diagnostics
500	30.9	31.7	31.9	30.2
50	34.0	35.1	35.1	33.1
	33.9	34.9	34.6	33.0
25	34.6	35.6	34.8	33.4
	34.8	35.4	36.2	33.8
5	35.8	38.4	N/A	35.6
	36.2	37.8	37.8	36.5
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A

### <IC (FAM 通道) Ct 值>

拷贝数	AMPLIRUN SARS-CoV-2 RNA CONTROL	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control1 (MT007544.1)	AcroMetrix Coronavirus 2019(COVID-19) RNA Control	EDX SARS-CoV-2 Standard
	Vircell	Twist Bioscience,	Thermo scientific	Exact Diagnostics
500	25.8	25.8	25.7	25.8
50	25.6	25.9	25.6	25.7
	25.9	25.5	25.9	25.3
25	25.8	25.5	26.0	25.8
	25.5	25.7	25.9	25.7
5	25.4	25.5	25.7	26.0
	25.5	25.5	26.0	26.8
NTC	25.5	25.4	25.4	25.9

Realtime PCR 装置：CFX96 Touch Deep Well (Bio-Rad) (阈值 100\*)

\* 关于阈值，需根据仪器种类、型号进行调整。

## [9] 问题对策

现象	原因	对策
阳性试验样本不能检测出。	试验样本的粘性过高。	用 PBS 将试验样本稀释、剧烈搅拌、离心取上清后进行实验。 或者将试验样本用 Suptazyme 处理、再进行 RNA 抽提。
	试验样本添加量过多。	减少试验样本再进行检测。
	预处理液与悬浊液上清没有混合完全。	请确认预处理液与悬浊液上清在 PCR 管的底部充分混合。
	阳性对照质量劣化。	请更换阳性对照。 请避免冻融、分装成小管保存，请勿再使用稀释的阳性对照。
	产生了 carryover 污染。	试剂·水废弃后，请进行去除污染的处理（擦拭、UV 照射等）。
	试剂性能下降。	请使用新的试剂。
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 阴性对照呈阳性。</li> <li>- 全部试验样本都成阳性。</li> </ul>	产生了 carryover 污染。	试剂·水废弃后，请进行去除污染的处理（擦拭、UV 照射等）。 请将试剂制备、试验样本制备、PCR 扩增的区域单独进行区分开。



<销售商>

东洋纺（上海）生物科技有限公司

邮编：200122

邮箱：tech@bio-toyobo.cn

网址：<http://www.bio-toyobo.cn>

联系电话：021-58794900

公司地址：上海市浦东新区张杨路 500 号华润时代广场 28 楼 AL 单元

<生产商>

东洋纺株式会社敦贺生物工厂

地址：日本国福井县敦贺市东洋町 10 番 24 号