

# 水泡疹病毒（Vesivirus）检测试剂盒

## （PCR-荧光探针法）说明书

货号：BP-QN07-50

版本：03 版

本产品仅供研究用

珠海横琴宝锐生物科技有限公司

## 【产品名称】

水泡疹病毒（Vesivirus）检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

## 【包装规格】

50 Reactions/盒

## 【预期用途】

本试剂盒用于定性检测细胞培养物等各种生物材料中是否有水泡疹病毒（Vesivirus）。

## 【产品简介】

本试剂盒利用 PCR-荧光探针法，针对水泡疹病毒（Vesivirus）两个基因的保守区域分别设计特异性引物探针，用于定性检测细胞培养物中的水泡疹病毒（Vesivirus）RNA。具有操作简便，检测快速，特异性强，灵敏度高，避免病毒变异导致假阴性等特点，且能够快速、准确的检测出在生物制药中出现过的所有 Vesivirus 病毒株。

内标（IC）可在样品提取阶段加入，以评估提取效果；也可在 PCR 扩增反应阶段加入，以监控扩增反应是否存在抑制，防止假阴性结果的产生。

本试剂盒含有 UDG 酶，用于预防扩增产物的污染。

本试剂盒与珠海横琴宝锐生物科技有限公司的核酸提取或纯化试剂盒 I（磁珠法）配套使用，高效提取样品中的 Vesivirus RNA，检测限可达到 0.5copy/μL。

## 【主要成分与含量】

试剂盒中含有如下组分：

试剂盒组分	规格（50 Reactions/盒）
Vesivirus qPCR MIX 1	0.9mL×1 管
Vesivirus qPCR MIX 2	0.1mL×1 管
Vesivirus 阳性对照	1.5mL×2 管
Vesivirus 阴性对照	1.5mL×2 管
Vesivirus 内标	1.0mL×1 管

说明：

不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

实验操作中需要但试剂盒中未提供的试剂：核酸提取或纯化试剂盒。

## 【储存条件及有效期】

- 1、置于≤-20℃下避光保存，有效期 24 个月。
- 2、避免反复冻融，反复冻融次数不超过 7 次。
- 3、产品有效期及失效日期见标签。

## 【适用机型】

包括但不限于以下机型：SLAN-96P、SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统；ABI7500、ABI QuantStudio™ 5 实时荧光定量 PCR 仪；Roche LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪；伯乐 CFX96 定量 PCR 仪。

## 【检验方法】

从试剂盒中取出 Vesivirus qPCR MIX 1、Vesivirus qPCR MIX 2、Vesivirus 内标、Vesivirus 阴性对照、Vesivirus 阳性对照，置于室温融化，充分震荡混匀后瞬时离心备用。

## 1. 试剂准备

根据所要检测样品的数量，计算所需反应孔数 N，一般做 2 个重复孔。计算所需反应孔数  $N = (\text{待检样本数} + 1 \text{ 个阴性对照} + 1 \text{ 个阳性对照} + 1 \text{ 个无模板对照}) \times 2 + 1 \text{ 孔损耗量}$ 。

单孔 qPCR MIX 预混液 =  $18\mu\text{L}$  Vesivirus qPCR MIX 1 +  $2\mu\text{L}$  Vesivirus qPCR MIX 2，根据计算的检测数量配制 qPCR MIX 预混液，将相应数量预混液按照每孔  $20\mu\text{L}$  的量分装至 96 孔 PCR 板或者 PCR 八连管中。

## 2. 核酸提取纯化

使用核酸提取或纯化试剂盒对阴性对照，阳性对照，待测样本进行核酸的提取纯化，操作步骤参照核酸提取或纯化试剂盒说明书，内标加样量为  $10\mu\text{L}$ ，样本量为  $200\mu\text{L}$ 。

## 3. 扩增和检测：

3.1 按照  $20\mu\text{L}/\text{管}$  分装量将 Vesivirus qPCR MIX 分装至反应管后，按下列表格分别加入阴性对照、阳性对照、处理好的待测核酸配制反应液：

组分	单孔用量 ( $\mu\text{L}$ )
Vesivirus qPCR MIX	20
模板 RNA	20
总体积	40

\*若不使用试剂盒内标功能，提取时无需添加内标，程序设置时不设置 CY5 通道，结果分析时无需关注内标结果。

\*若样品提取时未添加内标，扩增时加内标，则配制 MIX 时每反应液加  $1\mu\text{L}$  内标，分装 qPCR MIX 时分装  $21\mu\text{L}/\text{反应}$ ，此时 PCR 总反应体积为  $41\mu\text{L}/\text{反应}$ 。

3.2 将上述配制好的反应液，盖好反应管盖，混匀后瞬时离心，转移到荧光 PCR 仪器上。

3.3 将反应管放置在荧光 PCR 仪样品槽中，在荧光 PCR 仪上运行以下程序：

步骤	条件	循环数
UDG 处理	$25^{\circ}\text{C}$ ：5 分钟	1
反转录	$50^{\circ}\text{C}$ ：30 分钟	1
预变性	$95^{\circ}\text{C}$ ：3 分钟	1
PCR 扩增	$95^{\circ}\text{C}$ ：10 秒， $60^{\circ}\text{C}$ （采集荧光）：30 秒	45

荧光通道选择 FAM、CY5，其中 FAM 为靶标基因，CY5 为内标基因。若仪器为 ABI 系列时，参比荧光选择 ROX。

## 4. 结果判定

### 4.1 阈值线的设定

阈值线依据仪器噪声情况进行调整，以超扩增曲线基线期且处于刚进入指数扩增期为准。若仪器自动阈值线达到上述需求，也可以采用仪器自动阈值。

### 4.2 实验成立条件

质控样品	FAM 信号	CY5 信号
NTC	2 复孔 Ct $\geq$ 38 或扩增曲线无明显起峰	/
NCS	2 复孔 Ct $\geq$ 38 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增
PC	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增	/

\*质控标准应基于实验室验证数据，以满足检测限要求为基准。

#### 4.3 结果判定

FAM 信号	CY5 信号	结果判断
2 复孔有 1 孔以上 Ct $<$ 38 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增	阳性
	2 复孔 Ct $\geq$ 35 或扩增曲线无明显起峰	阳性，有抑制
2 复孔 Ct $\geq$ 38 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增	阴性
	2 复孔 Ct $\geq$ 35 或扩增曲线无明显起峰	阴阳性无法判断，有抑制

\*CY5 信号如果有抑制，需重测或查找并排除抑制因子。

#### 【注意事项】

- 1、试剂盒应在-20℃以下保存。
- 2、实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按照操作步骤执行，在操作过程中对时间、试剂体积等精确控制可以获得最好的结果。
- 3、核酸提取有关耗材确保洁净、无 DNase/RNase，提取过程尽量低温、快速，完成后进入下一步实验或冷冻保存。
- 4、不要使用过期组分或者不同批次组分混合使用。
- 5、冻存试剂使用前应于室温下完全融化，瞬时离心使液体完全沉于管底。避免反复冻融，以免影响试剂性能。
- 6、要带新的一次性 PE 手套对反应管封盖，避免徒手或使用过的手套接触反应管，检测过程中使用不带荧光物质一次性无粉乳胶手套。
- 7、实验室应严格按照有关规定分区管理，依照配液区→模板提取区→扩增区→分析区顺序进行基因检测。各区间人员、器材、试剂及空气流向应有严格要求。
- 8、样品、校准品等在使用后及时封盖，避免组分间及气溶胶等的污染造成假阳性。
- 9、扩增产物禁止开盖，实验产生的废弃物应及时收集，远离 PCR 实验室进行无害化处理。
- 10、如果样本中靶标为强阳性时，由于体系的竞争抑制，可能会对内标检测造成影响。

#### 【免责声明】

在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

#### 【公司信息】

邮箱：marketing@biori.com.cn

网址：www.biori.com

