

呼肠孤病毒 3 型 (REO-3) 核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

货号: BP-QN130-100

版本: 01 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】
呼肠孤病毒 3 型（REO-3）核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】
100 Reactions/盒

【预期用途】
本试剂盒用于定量分析检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中的呼肠孤病毒 3 型（REO-3）核酸。

【产品简介】
本试剂盒采用 PCR-荧光探针法，针对呼肠孤病毒 3 型（REO-3）的保守序列设计引物探针，能够定量检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中呼肠孤病毒 3 型（REO-3）核酸。试剂盒含有内标，用于监控提取与扩增是否异常，防止假阴性的产生。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核酸提取或纯化试剂盒 II（磁珠法）配套使用，酸性或特殊类型基质的样本建议搭配 RNA 样本前处理试剂盒使用。

【主要成分与含量】

试剂盒组分	规格（100 Reactions/盒）
REO-3 qPCR MIX1	0.9 mL×2 管
REO-3 qPCR MIX2	0.2 mL×1 管
REO-3 内标*	1.0 mL×1 管
REO-3 阴性对照	1.0 mL×2 管
REO-3 校准品 ST1	0.5 mL×1 管（3×10 ¹ copies/μL）
REO-3 校准品 ST2	0.5 mL×1 管（3×10 ² copies/μL）
REO-3 校准品 ST3	0.5 mL×1 管（3×10 ³ copies/μL）
REO-3 校准品 ST4	0.5 mL×1 管（3×10 ⁴ copies/μL）
REO-3 校准品 ST5	0.5 mL×1 管（3×10 ⁵ copies/μL）

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。

*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，分析时无需关注 CY5 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 1μL 内标，分装 qPCR MIX 时分装 21μL/反应，此时 PCR 总反应体积为 31μL/反应。

【储存条件及有效期】

- 1、试剂盒于≤-20℃避光保存，有效期 24 个月。
- 2、试剂盒避免反复冻融，冻融次数不超过 10 次。
- 3、产品批号及有效期：见产品外包装。

【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 REO-3 qPCR MIX1、REO-3 qPCR MIX2、REO-3 内标、REO-3 阴性对照、REO-3 校准品 ST1-ST5，置于室温融化，充分震荡混匀后瞬时离心备用。

1. 加样回收质控 ERC 制备

根据*需要设置 ERC 中的 REO-3 加标浓度（加标浓度一般为样品实际残留核酸浓度的 2-10 倍,以制备 REO-3 加标 3×10⁴copies 的 REO-3 RNA 量的 ERC 为例），具体操作如下：

- 1) 取 100μL 待测样本加入 1.5mL 干净的离心管中。
- 2) 加入 10μL REO-3 校准品 ST3 后混匀瞬时离心，标记为样本 ERC。样本 ERC 和同批待测样本一起进行核酸提取纯化，得到的核酸即为样本 ERC 核酸。

*加标方案需要根据样品实际的残留 RNA 浓度，确定是否需要稀释及最终的加标浓度。如果需要稀释建议使用本试剂盒阴性对照或者其他经验证的稀释液进行稀释，建议加标后标的浓度一般为样品残留 RNA 浓度的 2-10 倍。

2. 反应液准备

2.1 根据待测标本数（N），计算所需的 PCR 反应液数，一般建议做 3 个重复/样本。

PCR 反应液数（N）=（5 个浓度梯度的标准曲线+1 个无模板对照 NTC+1 个阴性质控 NCS +待测样本+待测样本 ERC）×3。分别取 REO-3 qPCR MIX1、REO-3 qPCR MIX2 按下表比例进行混匀。

组分	单孔用量
REO-3 qPCR MIX1	18μL×（N+1）
REO-3 qPCR MIX2	2μL×（N+1）

然后将相应数量的 PCR 反应液，按照一孔 20μL 的量分装至 96 孔 PCR 板或者 PCR 八连管中。

2.2 各反应孔加样示例：

组分	加样量
标准曲线	20μLREO-3 qPCR MIX + 10μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20μLREO-3 qPCR MIX + 10μL 阴性对照
NCS	20μLREO-3 qPCR MIX + 10μL NCS 纯化液
待测样本	20μLREO-3 qPCR MIX + 10μL 待测样本纯化液
样本 ERC	20μLREO-3 qPCR MIX + 10μL 样本 ERC 纯化液

3. 样本核酸提取：

操作步骤参照核酸提取或纯化试剂盒说明书，样本量为 100μL，内标添加量为 10μL。

4. 荧光 PCR 反应：

4.1 按照 2.2 的方法将核酸加入到 REO-3 qPCR MIX 中，盖好反应管盖或者用光学膜封闭 96 孔 PCR 板，混匀后瞬时离心，转移到荧光 PCR 仪器上。

4.2 在荧光 PCR 仪上运行以下程序：

步骤	条件	循环数
UDG 处理	25℃*：2 分钟	1
逆转录	50℃：15 分钟	1
预变性	95℃：3 分钟	1
PCR 扩增	95℃：10 秒，60℃（采集荧光）：30 秒	40
冷却	25℃*：10 秒	1

荧光通道选择 FAM、CY5，其中 FAM 为 REO-3 基因，CY5 为内标。若仪器为 ABI 系列，参比荧光选择 ROX。

*若荧光 PCR 仪温度无法设置 25℃，可将 UDG 处理和冷却步骤温度设置为 37℃。

5. 结果判定

5.1 阈值线设定

阈值线依据仪器噪声情况进行调整，将阈值线设置到超过本底信号波动位置。

5.2 内标的判读

对于阴性结果内标 Ct 值应≤35；对于阳性结果，可能会因为竞争抑制，导致阳性结果内标不出值或者出值较差。

5.3 试验成立条件

NTC, NCS 的 FAM 通道显示无 Ct 值或无典型扩增曲线；标准曲线线性相关性 $R^2 > 0.98$ 。

6. 结果分析

6.1 以 SLAN-96P 为例。

- 1) 若需要调整阈值线，在“实验分析”面板的“参数设置”中，将阈值设置到超过本底信号波动位置。
- 2) 在“孔板编辑”面板中，将校准品的“样本类型”一栏设置为标准品，并且在“属性”一栏通道 1 分别赋值为 3×10^1 、 3×10^2 、 3×10^3 、 3×10^4 、 3×10^5 （含义为每孔加入的 REO-3 浓度，单位为 copies/ μ L），并且在相应的“样本名称”一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。
- 3) 在“实验分析”的“标准曲线”面板中，可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率。
- 4) 在“实验分析”的“反应孔信息表”面板中，“浓度”一栏可读取检测结果的浓度值，单位为 copies/ μ L。根据待测样本和样本 ERC 的检测结果计算加样回收率，加样回收率要求在 50%~150%之间。

6.2 以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.4 为例。

1) 若需要调整阈值线，在 Analysis 的 Amplification Plot 面板中，将 FAM 和 CY5 通道 Threshold 设置到合适高度，点击 Analyze。

2) 在 Setup 的 Plate Setup 面板中，将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard，并且在 Quantity 一栏分别赋值为 3×10^1 、 3×10^2 、 3×10^3 、 3×10^4 、 3×10^5 （含义为每孔加入的 REO-3 浓度，单位为 copies/ μ L），并且在相应的 Sample 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC，将阴性质控 NCS 孔、待测样本孔、样本 ERC 孔的 Task 一栏设置为 Unknown，并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S、ERC。

3) 在 Analysis 的 Standard Curve 面板中，可读取标准曲线的 Slope、Y-Inter、 R^2 等。

4) 在 Analysis 的 View Well Table 面板中，Quantity 一栏可读取检测结果的浓度值，单位为 copies/ μ L。根据待测样本和样本 ERC 的检测结果计算加样回收率，加样回收率要求在 50%~150%之间。

【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。
- 11、建议使用各仪器新版本的软件进行实验及数据分析。

【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

