天净沙系列

CAT#:15-60900yd
低温运输，-20℃保存

天净沙

2020 年中国药典鼠源性病毒-仙台病毒检查试剂盒 (荧光定量 RT-PCR 探针法)

使用手册 V1.01

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品根据 2020 年中国药典开发，专门用于检测仙台病毒（Sendai Virus）。它具有下列特点：

1. 根据中国药典开发，达到合规要求。
2. 即开即用，用户只需要提供待测样本。
3. 本产品包括 DNA-RNA 病毒纯化试剂盒(沉淀法)、逆转录试剂盒(随机引物法)、探针法 qPCR 等通用试剂。
4. 本产品还提供满足 2020 年中国药典要求的仙台病毒专一性 PCR 引物、探针和质粒标准品。但本试剂不提供灭活的仙台病毒。
5. 本产品足够 50 次病毒核酸纯化(每次处理 0.2 mL 样本)、50 次 50 μL 体系的随机引物法逆转录反应和 50 次 20 μL 体系的探针法 qPCR 反应。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用双热封袋包装（纯化试剂和转录扩增试剂各一个热封袋包装）

成分	编号	规格	包装
病毒 DNA-RNA 纯化试剂盒(沉淀法)	220569	50 次	热封袋含手册
逆转录试剂盒（无 Oligo dT 引物）	960906M	50 次	五孔盒含手册
仙台病毒 qPCR 相关成分	15-60900yd-pt1	50 次	十一孔盒无手册
使用手册	Sc60900yd	1 份	无

仙台病毒 qPCR 相关成分，编号 15-60900yd-pt1，十一孔盒包装

成分	编号	规格	包装
荧光 PCR 模板专用稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
2×探针法 qPCR MasterMix	981201m	500 μL	0.5 mL 本色管
仙台病毒质粒标准品溶液(2E9 拷贝/μL)	pc60900yd	50 μL	0.5 mL 黄盖管
仙台病毒上游引物干粉	yw15-60900yd-F	50 次	0.5 mL 白盖管
仙台病毒下游引物干粉	yw15-60900yd-R	50 次	0.5 mL 紫盖管
仙台病毒探针干粉	pb15-60900yd	50 次	0.5 mL 棕色管

注意：

引物、探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中各加入 50 μL 的超纯水充分混匀后得到仙台病毒上游引物溶液(5 pmol/μL)、下游引物溶液(5 pmol/μL)、探针溶液(2.5 pmol/μL)后再使用，未用完的需要-20℃保存。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备试剂	灭活仙台病毒、超纯水
使用方法	**注意事项**：本手册根据 2020 年中国药典编写，如有不同之处请以中国药典为准。 **一、核酸纯化** 1. 按照病毒 DNA-RNA 纯化试剂盒使用手册对样本进行 RNA 纯化，每次使用 0.2 mL 样本。如果有 N 个供试样本，加上 1 个 RNA 纯化阳性对照(用确认是阳性样本或灭活仙台病毒为起始材料)和 1 个 RNA 纯化阴性对照(用确认是阴性样本或超纯水为起始材料)，则共有 N+2 个样本需要进行核酸纯化。药典要求每个样本需要做三次重复，故共需要进行(N+2)×3 次 RNA 纯化，所得纯化的 RNA 需要放-70℃备用。 **二、逆转录** 2. 按照逆转录试剂盒的使用手册对所得 RNA 进行逆转录。对于(N+2)×3 个 RNA 样本，则需要设置(N+2)×3 个逆转录反应。由于采用随机引物进行逆转录反应，故此步不需要使用仙台病毒专一性引物。所得 cDNA 反应液放冰上待用作后续 qPCR 的模板。未用完的 cDNA 可放-20℃长期保存。 **三、制备质粒标准品梯度稀释液及 PCR 灵敏度对照** 3. 标记 9 个 1.5 mL 塑料离心管，分别为 8 号管到 0 号管。 4. 用带芯枪头在每个管中分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液。 5. 在 8 号管中加入 5 μL 2E9 拷贝/μL 的质粒标准品溶液(本试剂盒提供)，充分涡旋震荡 1 分钟，得 2E8 拷贝/μL 的质粒标准品溶液。放冰上待用。 6. 换枪头，在 7 号管中加入 5 μL 2E8 拷贝/μL 的质粒标准品溶液(上步稀释所得)，涡旋震荡 1 分钟，得 2E7 拷贝/μL 的质粒标准品溶液。放冰上待用。 7. 换枪头，在 6 号管中加入 5 μL 2E7 拷贝/μL 的质粒标准品溶液(上步稀释所得)，涡旋震荡 1 分钟，得 2E6 拷贝/μL 的质粒标准品溶液。放冰上待用。 8. 重复上面的操作直到得到 9 个稀释度的质粒标准品梯度稀释液。放冰上待用。 **四、设置 Probe qPCR 反应** 9. 标记(N+2)×3+26 个 PCR 管，其中(N+2)×3 个用于第 1 步得到的(N+2)×3 个 DNA 样品，5 个用于标准曲线反应(用上步所得第 3 号到第 7 号管样为模板)；20 个用于 PCR 灵敏度反应 (10 个用上步所得第 0 号管样为模板，10 个用第 1 号管样为模板)；1 个用于 PCR 阴性对照反应 (以超纯水为模板)。 10. 配置 qPCR 扩增预混液：在 1 个 1.5 mL 塑料离心管中，加入(3N+32)×10 μL×1.1 的 2×探针法 qPCR MasterMix 和(3N+32)×2 μL×1.1 的超纯水，再分别加入(3N+32)×1 μL×1.1 的仙台病毒上游引物、下游引物和探针，轻柔混匀后在上步标记

的 PCR 管中各加入 15 μL 预混液。

11. 在第 9 步标记的 PCR 管中按下表再加入模板：

成分	PCR 阴性对照管	20 个灵敏度管	3N+6 个样品管	5 个标曲管 (3-7 管)
超纯水	5 μL	不加	不加	不加
第 9 步所得第 1 号样和 0 号样各 10 个	不加	各 5 μL	不加	不加
3N+6 个 cDNA 样本	不加	不加	各 5 μL	不加
第 9 步所得第 3 号到第 7 号 5 个样本	不加	不加	不加	各加 5 μL(第 3 号样到 3 号管，第 4 号样到 4 号管…)

12. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 qPCR:

过程	温度	时间
预处理	50℃	2 min.
预变性	95℃	10 min.
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15 sec.
	60℃	1 min(采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA)

四、结果判读

13. 灵敏度检查：只要 1 号质粒标准品稀释样全部检为阳性(10/10)，则本次实验的灵敏度检查合格，可以进行后续分析。如果不合格，请跟厂家联系。0 号质粒标准品稀释样的数据只供参考。

14. 标准曲线绘制：以质粒标准品梯度稀释液的 DNA 浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以供试样品的 Ct 值从标准曲线上推算出供试样品 cDNA 浓度的 log 值，再以 log 值推算出供试样品反应管中 cDNA 的拷贝数，此数据在第 16 步使用。

15. 试验有效性：如果标准曲线相关系数 R^2不低于 0.990；RNA 纯化阳性对照管的 Ct 值≤32，并呈标准的倒 S 型扩增曲线；PCR 灵敏度对照管的 Ct 值≤35；PCR 阴性对照管的 Ct 值＞35，无明显的倒 S 型扩增曲线，则本次实验有效，可以继续按下步的操作分析供试样本的数据。如果没有得到上面的结果（阳性对照样本的结果为阴性，或阴性对照样本的结果为阳性），则本次实验无效，不需要分析供试样本数据。需要找到原因后再继续实验。

16. 供试品结果判定：如果供试品管的 Ct 值≤35，同时在第 13 步根据标曲计算出的 DNA 拷贝数≥20，且有标准的倒 S 型扩增曲线，则判定该供试品为仙台病毒阳性。否则为阴性。

关联产品	2020 年中国药典鼠源性病毒-小鼠腺病毒检查试剂盒

20241118zhy