

REO-3 病毒核酸检测试剂盒 (RT-PCR 荧光探针法) 说明书

货号：1506733

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点和常见问题！

版本：A/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

SHENTEK® REO-3 病毒核酸测试剂盒 (RT-PCR 荧光探针法) 与 SHENTEK® 病毒核酸提取试剂盒 (磁珠法) 配套使用, 用于检测呼肠孤病毒 3 型 (Reovirus 3, REO-3)。适用于生物制品中对细胞库, 病毒种子批和牛血清中的 REO-3 病毒污染进行快速检测。

本试剂盒利用荧光探针法 RT-qPCR 技术, 检测灵敏度高, 最低检测限达到 50 copies/反应。检测特异性强, 与牛源病毒 (BVDV、PI-3、BAV-3、BPV), 工程细胞 (CHO、VERO、293T、MDCK、NS0、Sf9), 工程菌 (大肠杆菌、毕赤酵母) 和牛、猪基因组无交叉反应干扰。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
REO-3 Primer&Probe MIX	NNC093	200 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
5 \times RT-qPCR Buffer	NNB018	300 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
RT-qPCR Enzyme MIX	NNC079	100 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
IPC MIX	NNC066	150 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
RNase-Free H ₂ O	NND008	1.2 mL \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下

■ 规格

50 Reactions。

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月, 具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型 (包括但不限于以下机型, 使用前需验证检测灵敏度)

- SHENTEK-96S 定量 PCR 系统
- 7500 Real-Time PCR System
- CFX96 定量 PCR 系统
- Roche LightCycler 480 II

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL 或 2.0 mL 无菌 DNase/RNase-free 低吸附离心管
- 96 孔 qPCR 板或八联管

- 1000 μL , 200 μL , 100 μL , 10 μL DNase/RNase-free 低吸附带滤芯枪头
- 病毒核酸提取试剂盒（货号：1506730）
- **REO-3 阳性对照品，联系本公司订购**

■ 相关设备

- 生物安全柜
- 迷你离心机
- 漩涡振荡器
- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μL , 200 μL , 100 μL , 10 μL 移液枪

■ 实验操作流程

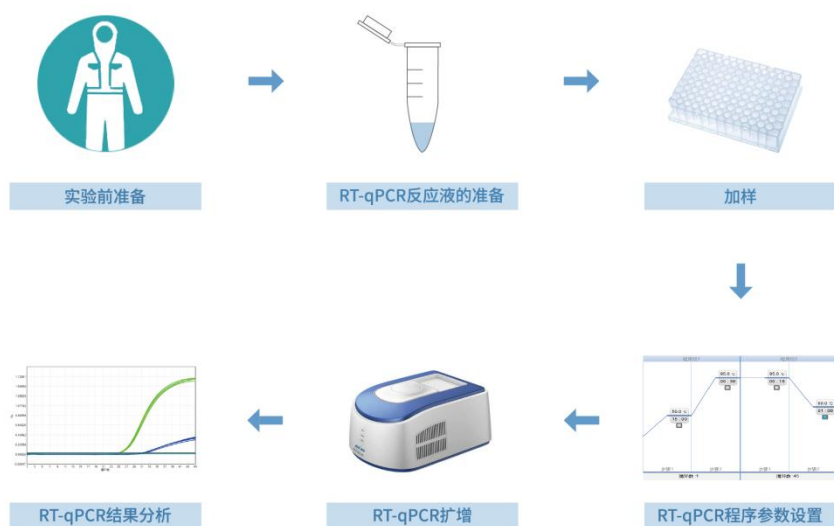


图 1 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

（一）实验前准备：

1. 穿戴实验服、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
2. 有感染性病毒提取检测和有感染性病毒阳性对照品处理建议在 P2 实验室和生物安全柜中进行。
3. 检测过程中严格使用无核酶的试剂和耗材。

4. 需要使用的试剂提前取出置于冰上融解并充分混匀。

(二) 病毒核酸提取:

● 待测样品的病毒核酸提取

1. 使用**病毒核酸提取试剂盒** (货号: 1506730) 对样品中的病毒核酸提取纯化。对于细胞基质样品, 参考病毒核酸提取试剂盒说明书里的细胞基质方法 2 流程进行病毒核酸提取 (具体步骤请参考病毒核酸提取试剂盒说明书)。

2. 待测样品提取纯化液在进行 **RT-qPCR** 检测前先进行热处理, **95°C, 3 分钟**后, 暂时保存于 **4°C** 冰箱。

● 阳性对照品 (PCS)

使用 REO-3 阳性对照品作为阳性对照 PCS, 在提取阶段和同批待测样品一起进行相同的样品前处理, 制备成 PCS 纯化液用于 RT-qPCR 检测。

● 阴性对照品 (NCS)

使用样品基质溶液 (或 RNase-Free H₂O) 作为阴性对照 NCS, 在提取阶段和同批待测样品一起进行相同的样品前处理, 制备成 NCS 纯化液用于 RT-qPCR 检测。

(三) RT-qPCR 反应液准备:

1. 根据所要检测样品数量, 计算所需反应孔数, 一般做 2 个重复孔/样。

$$\text{反应孔数} = (1 \text{ 个无模板对照 NTC} + 1 \text{ 个阴性质控样品 NCS} + 1 \text{ 个阳性质控样品 PCS} + N \text{ 个待测样品}) \times 2$$

2. MIX 总量计算: 根据反应孔数计算所需的 RT-qPCR MIX 总量。

$$\text{RT-qPCR MIX} = (\text{反应孔数} + 2) \times 10\mu\text{L} \text{ (含有 2 孔的损失量)}$$

3. 根据表 2 准备各试剂 RT-qPCR MIX 用量。

表 2. RT-qPCR MIX 配制表

组分	单孔用量
REO-3 Primer&Probe MIX	3.7 μL
5 \times RT-qPCR Buffer	4 μL
RT-qPCR Enzyme MIX	1 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	10 μL

二、操作步骤

(一) 加样

1. 将所有溶液振荡混匀后按表 3 和表 4 所示加样:

表 3.各反应孔加样示例

各样品	加样量
无模板对照 NTC	10 μ L RT-qPCR MIX + 10 μ L RNase-Free H ₂ O
阴性质控样品 NCS	10 μ L RT-qPCR MIX + 10 μ L NCS 纯化液
阳性质控样品 PCS	10 μ L RT-qPCR MIX + 10 μ L PCS 纯化液
待测样品	10 μ L RT-qPCR MIX + 10 μ L 待测样品提取纯化液

 待测样品提取纯化液 **95°C金属浴 3min** 后再进行加样。

表 4. 96 孔板排版示例

NCS	NCS				S1	S1				PCS	PCS	A
					S2	S2						B
					S3	S3						C
					S4	S4						D
					S5	S5						E
												F
												G
NTC	NTC											H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

- ✧ 该示例表示的是检测 1 个阴性质控样品 NCS、1 个无模板对照 NTC、1 个阳性质控样品 PCS、5 个待测样品。每个检测做 2 个重复孔。
- ✧ 实际检测时可根据样品多少，参照表 4 示例进行 96 孔板排版加样。

(二) 程序参数设置

将八联管用配套管盖盖紧或 96 孔板用光学膜封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心 10 秒后放入 qPCR 仪，接着进行 RT-qPCR 程序设置：

- **SHENTEK-96S** 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例：


1. 点击“实验向导”。
2. “孔板编辑”页面中选择步骤 1：选择反应孔。

3. 选择步骤 2: 选择项目中的“**REO-3 病毒检测**”程序。
4. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。
- **其他定量 PCR 系统**程序设置如下:
 1. 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
 2. 创建新检测探针, 命名为“REO-3”, 选择报告荧光基团为 FAM, 猝灭荧光基团为 none; 创建 VIC 探针, 选择报告荧光基团为 VIC, 猝灭荧光基团为 none, 检测参比荧光为 ROX (可选)。
 3. 设置 RT- qPCR 反应程序:
 - 50 °C 逆转录 15 分钟;**
 - 95 °C 预变性 30 秒;**
 - 95 °C 15 秒, 60 °C 1 分钟 (读取荧光), 45 个循环;**
 - 反应体积 20 μ L。

三、结果计算与判断

(一) 结果计算

- 1、以 **SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统**、软件版本 8.2.2 为例。
 1. “孔板编辑”页面中步骤 3: 定义反应孔, 将 NTC 孔的样品类型设置为无模板对照, NCS 孔设置为阴性对照, 待测样品孔设置为待测样品。
 2. 在“实验分析”页面点击 , 在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值。
- 以 **7500 Real-Time PCR System**、软件版本 1.4 为例:
 1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, 将 Threshold 设置为 0.02, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。
 2. 在 Results 的 Plate 面板中, 将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将阴性质控 NCS 孔、待测样品孔、PCS 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、PCS, 之后点击 .
 3. 在 Results 的 Report 面板中, Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品、PCS 的检测值。

 上述示例结果分析的参数设置仅供参考, 具体需依据实验室机型及使用

的软件版本进行设定，一般也可由仪器自动判读。

(二) 结果判断

1. NTC、NCS、PCS 检测结果参考表 5:

表 5.质控结果分析

质控样品	FAM 信号	VIC 信号
NTC	2 复孔 Ct \geq 40 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增
NCS	2 复孔 Ct \geq 40 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增
PCS	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增	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，可从满足检测限要求考虑。

2. 待测样品检测结果判定参考表 6:

表 6.待测样品检测结果分析

FAM 信号	VIC 信号	结果判断
2 复孔有 1 孔以上 Ct $<$ 40 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct $<$ 40 且有效的“S”型扩增	阳性
	2 复孔 Ct \geq 40 或扩增曲线无明显起峰	阳性，有抑制
2 复孔 Ct \geq 40 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct $<$ 40 且有效的“S”型扩增	阴性
	2 复孔 Ct \geq 40 或扩增曲线无明显起峰	阴阳性无法判断，有抑制

* VIC 信号如果有抑制，需重测或对样品进行合适处理消除抑制因子。

生效日期：2023 年 05 月 29 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话：0572-2165910