

诺如病毒（norovirus）GII 型荧光 RT-PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-914-2

为了适应贝类诺如病毒快速检测和疫病研究的需要，本公司根据出入境检验检疫行业标准(SN/T 4055-2014)中推荐的引物和探针序列，经多次实验及系统优化，开发生产了本试剂盒。应用本试剂盒进行检测具有快速、灵敏、特异、准确、操作简单、应用广泛和高通量检测等特点及优点。

2、试剂盒组成

试剂盒组成包括核酸扩增试剂。具体组成参见表 1：

表 1：试剂盒组成（50test/盒）

试剂盒组成成分	体积
核酸提取试剂：核酸裂解液	15ml×2 管
核酸扩增试剂：DEPC 水	1ml×1 管
诺如 GII 型荧光 RT-PCR 反应液	750μL×1 管
酶混合物	60μL×1 管
阴性对照	1ml×1 管
诺如 GII 型 阳性对照	1ml×1 管

（注：核酸提取试剂可使用本公司生产的提取核酸更快捷方便的《病毒 RNA 柱式提取试剂盒》）

3、样本采集, 存放及运输

3.1 样本采集：所用取样器材必须经高压灭菌并烘干。

取贝类中肠腺组织约 5 g，加入 35 mL 的甘氨酸缓冲液高速匀浆，37℃ 孵育 30 min，4℃ 10,000g 离心 30 min。取上清，加入等体积 PEG8000，反复颠倒混匀，冰上放置 1 h，4℃ 10,000g 离心 5 min，弃上清。保留沉淀备用。

3.2 存放：样本在 2℃—8℃ 条件下保存应不超过 24 h；-70℃ 以下可长期保存，但应避免反复冻融（最多冻融 3 次）。

3.3 运输：采用冰壶或泡沫箱加冰密封进行运输。

4、荧光 RT-PCR 检测

4.1 操作方法

4.1.1 样本的处理（在样本制备区进行）：

4.1.1.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，其中 n 为被检样品与阴性对照的和（阳性对照、阴性对照在试剂盒中已标出），做标记。（注：试剂盒中的阳性对照直接作为 PCR 检测的模板，无需提取核酸）

4.1.1.2 每管加入 600 μL 裂解液，分别加入被检样本和阴性对照各 200 μL，一份样本换用一个吸头，再加入 200 μL 氯仿，混匀器上振荡混匀 5 s（不能过于强烈，以免产生乳化层，也可以用手颠倒混匀），于 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min。

- 4.1.1.3 取与 4.1.1.1 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，加入 500 μL 异丙醇 (-20°C 预冷)，做标记。吸取 4.1.1.2 各管中的上清液转移至相应的管中，上清液应至少吸取 500 μL ，不能吸出中间层，颠倒混匀。
- 4.1.1.4 于 4°C 、12 000 r/min 离心 15 min (Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置)，小心倒去上清，倒置于吸水纸上，沾干液体 (不同样品须在吸水纸不同地方沾干)；加入 600 μL 75% 乙醇，颠倒洗涤。
- 4.1.1.5 于 4°C 、12 000 r/min 离心 10 min (Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置)，小心倒去上清，倒置于吸水纸上，尽量沾干液体 (不同样品须在吸水纸不同地方沾干)。
- 4.1.1.6 4 000 r/min 离心 10s (Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置)，将管壁上的残余液体甩到管底部，小心倒去上清，用微量加样器将其吸干，一份样本换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面，室温干燥 3 min，不能过于干燥，以免 RNA 不溶。
- 4.1.1.7 加入 11 μL DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2 000 r/min 离心 5 s，冰上保存备用。提取的 RNA 须在 2 h 内进行 PCR 扩增；若需长期保存须放置 -70°C 冰箱内。
【也可参照《病毒 RNA 柱式提取试剂盒说明书》(货号：HB-QPCR-01) 使用，更方便快捷提取核酸】。

注：提取的 RNA 须在 2 h 内进行 PCR 扩增；若需长期保存须放置 -70°C 冰箱内。

4.1.2 检测

4.1.2.1 扩增试剂准备 (在反应混合物配制区进行)：

从试剂盒中取出相应的荧光 RT-PCR 反应液、酶混合物，在室温下融化后，2000 r/min 离心 5 s。设所需荧光 RT-PCR 检测总数为 n，其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和，每个样品测试反应体系配制见表 2：

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	RT-PCR 反应液	酶混合物
用量	15 μL	1.0 μL

根据测试样品的数量计算好各试剂的使用量，加入到适当体积试管中，充分混合均匀，向每个荧光 RT-PCR 管中各分装 16 μL ，转移至样本处理区。

4.1.2.2 加样 (样本处理区进行)：

在各设定的荧光 RT-PCR 管中分别加入上述样本处理步骤 4.1.1.7 中制备的 RNA 溶液各 10 μL ，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。(阳性对照不需要提取核酸，使用前直接吹打混匀后吸取当模板)

4.1.2.3 荧光 RT-PCR 检测 (在检测区进行)：

将 4.1.2.2 中离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

循环条件设置：

第一阶段，反转录 48°C /45 min， 50°C /2 min

第二阶段，预变性 95°C /10 min；

第三阶段， 95°C /15s， 60°C /60s，40 个循环，在第三阶段每次循环的 60°C 退火延伸时收集荧光。

试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

4.2 结果判定

4.2.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

4.2.2 质控标准

公司地址：北京市顺义区南法信顺畅大道 14 号院东亚首航国际 1 号楼 3 层 329 室

公司网址：www.halcyonbio.com

邮 箱：haisentong@126.com

电话：010-50933811, 13718421576, 17718526815

客服 QQ：737481857 835171324



- 4.2.2.1 阴性对照无 Ct 值或无扩增曲线。
- 4.2.2.2 阳性对照的 Ct 值应 <25.0 ，并出现典型的扩增曲线。否则，此次实验视为无效。
- 4.2.3 结果描述及判定
 - 4.2.3.1 阴性
无 Ct 值或无扩增曲线，示样品中无诺如病毒 GII 型核酸。
 - 4.2.3.2 阳性
Ct 值 ≤ 30 ，且出现典型的扩增曲线，示样品中存在诺如病毒 GII 型核酸。
 - 4.2.3.3 有效原则
Ct 值 >30 的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性，否则为阳性。

5、相关技术信息（引物和探针序列）

F: CARGARBCNATGTTYGRTGGATGAG

R: TCGACGCCATCTTCATTCACA

Probe: FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA