

# 水中SARS-CoV-2 RT-PCR 试剂盒

中文版

用于实时荧光定量PCR检测从污水样品中的SARS-CoV-2的RNA

# 目录

用途.....	1
产品描述.....	1
材料和存储.....	2
未提供材料.....	2
警告和注意事项.....	3
污水样品收集.....	4
水浓缩实验步骤.....	4
提取.....	5
PCR.....	5
干燥样品的溶解.....	5
质量控制.....	6
测试方法.....	7
检测限制.....	8

## 水中 SARS-CoV-2 RT-PCR 试剂盒

### 用途

水中SARS-CoV-2 RT-PCR试剂盒是一种实时荧光逆转录聚合酶链反应测试，用于检测污水中SARS-CoV-2中的核酸。水中 SARS-CoV-2 RT-PCR 试剂盒旨在由经过专门指导和训练的特别是具有实时核酸扩增技术的合格和训练有素的实验室人员使用。

### 产品描述

水中SARS-CoV-2 RT-PCR试剂盒是一种实时逆转录聚合酶链反应 (RT-qPCR) 测试，它使用CDC设计描述的N1和N2引物和探针序列。SARS-CoV-2 混合物包括扩增时使用的RNA Master Mix以及用于检测 SARS-CoV-2 RNA 的引物和探针。SARS-CoV-2 RNA 靶点 (N1 和 N2) 均在 FAM 通道中检测到。

RT-qPCR过程反向转录病毒RNA到cDNA，随后使用实时PCR循环实验方法扩增。荧光强度在每个PCR周期由实时PCR仪器之一进行监测，这些仪器列在“未提供的材料”部分。

此外，水中SARS-CoV-2 RT-PCR试剂盒使用阳性对照 (PC) 和PCR级水 (阴性对照)。阳性对照 (PC) 包含SARS-CoV-2合成材料，可作为反应的阳性参照。PCR级水用作RT-PCR阴性对照，以及溶解干燥的SARS-CoV-2混合物和阳性对照 (PC)。

1. “新型冠状病毒疾病 2019 (COVID-19) 实时 RT-PCR 引物和探针。”疾病控制和预防中心，2020年3月6日，[www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html](http://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html)

## 材料和存储

名称/主要信息	盖子颜色	数量	存储		冷冻/解冻周期
		100 次测试	收到时	溶解后	
<b>SARS-CoV-2 混合物, 干燥</b> <b>REF</b> 61-56616-00 包含 N1 和 N2 引物和探针。在 1 mL PCR 级水中溶解。将 SARS-CoV-2 混合物在避光保存。小瓶上的过期日期对干燥或溶解的样品都有效。	红	1 x 1.0 mL	-25 至 8° C	-25 至 -15° C	<6
<b>RNA 主混合物 (RNA MMx)</b> <b>REF</b> 61-56618-00 浓缩主混合物, 包括逆转录酶和热启动聚合酶。RNA MMx 比大多数主混合物更粘稠, 请参阅测试步骤部分, 了解对于实验处理的建议。样品中添加了参考染料 (ROX), 用于归一化体积差异。避光保存 RNA MMx。	黑	1 x 1.0 mL	-25 至 -15° C (长期)	N/A	<6
<b>阳性对照, 干燥 (PC)</b> <b>REF</b> 44-56617-00 PC 包含 SARS-CoV-2 (N1 目标区域) 的靶点。重新将其溶解于 200 µL PCR 级水。小瓶上的到期日期对干燥或溶解的样品都有效。	蓝色	1 x 200 µL	-25 至 8° C	-25 至 -15° C	<6
<b>PCR 级水</b> <b>REF</b> 61-56619-00 PCR 级水可以被规范使用在逆转录-PCR (RT-PCR) 实验中。它用于溶解 SARS-CoV-2 混合物和阳性对照 (PC)。它还用作每次检测反应中的 PCR 阴性对照。请勿在 PCR 工作区域之间转移 PCR 级水瓶。每个区域都需要单独的小瓶水, 以避免污染风险。	无色	2 x 1.0 mL	-25 至 8° C	N/A	

**注意:** 有关说明书和标签上使用的符号的说明, 请参阅说明书插页末尾的表格。

## 未提供材料

- 相对离心力 (RCF) 至少 12,000 x g (最大值) 的 50 mL 离心管
- 低温离心机, 带转子和以 12,000 x g (最大 RCF) 离心所需的附件
- 聚乙二醇 (PEG), 平均分子量 8000, 分子生物学等级或同等级别
- NaCl, 分子生物学等级或同等级别
- 无核酸酶水, 分子级
- 涡旋混合器
- 无核酸酶, 抗气溶胶移液器枪头
- 微型离心管 (无脱氧核糖核酸酶/核糖核酸酶 DNase/RNase)
- 可达 1500 - 3000 x g 的微型离心机
- 移液器 (5-1000 µL); 用于制备 PCR 混合物的专用移液器
- Water DNA/RNA 磁珠套件 (98-0014719-00, 或提取或裂解材料)
- Seracare AccuPlex™ SARS-CoV-2 验证组 (材料编号: 0505-0129), 或合适的替代方案
- 符合现行处理传染性样品指南的个人防护设备
- 用于巴氏杀菌的水浴锅 (可选)

## PCR 附加材料

- 96 或 384 孔 PCR 多孔板以及透明胶粘膜/板或合适的替代品。
- 实时荧光定量 PCR 仪器 (Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® ViiA™ 7, Applied Biosystems QuantStudio 5, Agilent Mx3000P™, Agilent Mx3005P™, Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch™, Bio Molecular Systems Mic qPCR Cyclers, QIAGEN Rotor-Gene (72-Well Rotor only), Roche LightCycler® 480 or 同等仪器)。  
注意 - Roche LC480 仪器需要额外的校准和软件设置。IDEXX 技术服务可以为使用该仪器与 RealPCR 试剂提供指导。
- 带转子和多孔板的适配器的离心机 (可选)。

## 警告和注意事项

### 常规

处理污水样品需要遵守所有当地法规和安全准则。此外, 处理与 SARS-CoV-2 有关的污水样本请遵循当地卫生部门建议的程序。有关信息的来源之一是 美国疾病控制和预防中心 (CDC) 2019 年与冠状病毒疾病相关的样品处理的临时实验室生物安全指南 (COVID-19)。(https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html)。

- 使用符合当前处理潜在传染性样品指南的个人防护设备 (PPE)。
- 请勿在处理试剂以及人类相关样品的区域吃、喝、抽烟、涂抹化妆品或处理隐形眼镜。
- 按照当地、各州和联邦法规合理处理实验废物。

### PCR

- 必须按照说明中指定的方法存储和处理试剂。不要使用过期的样品。
- 整个过程必须在无核酸酶条件下执行。
- 处理试剂和核酸时, 请戴上无粉手套。
- 始终使用含气溶胶屏障的移液器枪头。使用的枪头必须是无菌的, 并且不含脱氧核糖核酸酶和 核糖核酸酶。
- 保持试剂和 PCR 混合物管子尽可能盖上盖子或被遮蔽。
- 为避免交叉污染, 所有移液枪使用无核酸、抗气溶胶移液器枪头, 并在物理空间上分离用于核酸提取/处理、PCR 准备工作和 PCR 的工作场所。
- 应使用清洁产品 (如 10% 漂白剂、“DNAzap™”或“RNase AWAY®”等清洁工作台、移液器和离心机, 以最大限度地降低核酸污染的风险。应使用 70% 乙醇去除残留漂白剂。

## 污水样品收集

- 污水样品应收集在适当的容器中，以保证有足够的样品量进行测试。有关污水取样程序的建议，请参阅水和废水水检验标准方法（第 9060 节）。
- 在将样品运输到实验室进行处理时，保持样品低温但不冷冻 ( $< 8^{\circ}\text{C}$ )。污水样品在收集后可在  $2-8^{\circ}\text{C}$  储存最多 72 小时。

## 浓缩步骤

### 巴氏杀菌（可选）：

1. 将容器的外表面消毒。可使用 70% 异丙醇以及/或暴露在短波（UV-C）下进行表面消毒。
2. 在  $60\pm 1^{\circ}\text{C}$  水浴中孵育样品 1.5 小时，在孵育过程中混合一次。水位必须充分覆盖容器，使得容器和样品达到目标温度。
3. 将样品冷却至  $2-8^{\circ}\text{C}$ ，然后继续浓缩。巴氏杀菌样品可于  $2-8^{\circ}\text{C}$  过夜储存。

### 浓缩：

其它浓缩方法也可用于处理污水样品，配套 Water SARS-CoV-2 RT-PCR 试剂盒。

1. 将样品充分混合，然后向 3 个空的 50 mL 离心管中各加  $35\pm 1$  mL 样品。
2. 在  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  下以 4700 RCF 将所有三个离心管离心 30 分钟。建议使用挂篮转子，以离心出稳定的细菌颗粒。不使用或少使用制动力，以防止扰动细菌颗粒。
3. 将  $3.5\pm 0.1$  g PEG 8000 和  $0.788\pm 0.01$  g NaCl 加入 3 个空的 50 mL 离心管中。
4. 迅速轻轻地从离心机中取出挂篮。小心平稳地从每个离心管中将清液转移到含有 PEG 和 NaCl 的 50 mL 离心管中，并防止扰动固体沉淀。
5. 在室温下将离心管中含有的 PEG 和 NaCl 混合，直到完全溶解。
6. 小心打开离心管（参见下面的浓缩步骤说明中推荐的操作）将清液转移至新的 50 mL 离心管。此步骤可防止在离心过程中由于粉末干扰到离心管盖的密封而发生泄漏。
7. 在靠近离心管底部的位置做标记，并在离心时朝向转子外部方向。这将有助于对不可见的病毒颗粒进行再悬浮。
8. 在  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  下以 12,000 RCF 离心 120 分钟。不使用或少使用制动力，以防止扰动细菌颗粒。
9. 迅速轻轻地，从离心机中取出转子。小心地从每个离心管中倒出大部分上层清液。动作保持平稳方向一致，以防止扰动沉淀颗粒。在这里没有必要去除所有液体，因为余下液体将在下一步中去除。
10. 在  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  下以 12,000 RCF 离心 5 分钟。不使用或少使用制动力，以防止扰动细菌颗粒。
11. 迅速轻轻地，从离心机中取出转子。使用移液器小心地从每个离心管中取出和丢弃剩余的上层清液。请勿用移液枪头接触或扰动沉淀颗粒。
12. 使用移液器将 0.4 mL 无核酸水转移到含有病毒颗粒的离心管之一。
13. 反复用移液枪润洗离心管内壁可能含有病毒颗粒的位置重新溶解病毒颗粒。对可能有病毒颗粒的区域进行大范围的润洗，以确保所有病毒颗粒都得到回收。一些溶解颗粒后的液体会粘附在离心管内壁，这些液体将在下一步中进行回收。

- 在 1,000 至 3,000 RCF 下快速旋转离心管, 将所有液体收集在管底。
- 上下吹打液体数次使浓缩物混合均匀, 然后将所有液体转移到含有病毒颗粒的第二支离心管中。重复步骤 13 和 14 以重新溶解病毒颗粒并收集所有液体。
- 上下吹打液体数次使浓缩物混合均匀, 然后将所有液体转移到含有病毒颗粒的第三支离心管中。重复步骤 13 和 14 以重新溶解病毒颗粒并收集所有液体。
- 将回收的浓缩物转移到无 RNA 酶的微型离心管中。体积应约为 0.4 mL。
- 立即进行核酸提取, 或在 -25 至 -15°C 下将浓缩物隔夜储存。

### 实验步骤说明 (浓缩) :

- 对于从 105 mL 污水中浓缩 SARS-CoV-2, 建议使用此程序。通过适当修改基本实验步骤, 使用适当的离心设备 (包括离心机、转子、管或瓶 以及任何其他必需的离心机附件), 可以分析更大或更小的体积。必须使用适当的填充量来确保样品保持在离心过程中保持平衡。
- 所有操作步骤都保证样品接近 4°C 的低温下进行。建议使用制冷离心机设备, 并在实际操作时保持转子、铲斗和其他设备低温。尽量缩短离心机外的操作时间并且避免延误, 以减少样品和离心转子的升温。
- PEG 和 NaCl 可能被塑料离心管的静电吸引。必须避免将粉末粘附在离心管口边缘上, 以防止影响离心管盖密封。
- PEG 和 NaCl 溶解后, 液体粘附在离心管盖内侧, 这可能会在打开管盖时使他们意外地被转移到管外。为了防止这种情况, 在打开离心管盖时建议采用以下方法: 将离心管静置 1 分钟, 使得多余的液体从盖子流下; 将盖子松开 1/2 圈; 暂停一秒钟; 继续松开盖子, 直到完全打开盖子; 然后小心地将盖子直接从管子上抬起来。
- 快速离心可通过将离心管暂时用约 2,000 RCF ( $\pm 1000$ ) 离心, 然后迅速用制动停止转子。

### 浓缩方法验证

IDEXX 建议首先执行验证程序, 以确保完整方法 (包括浓缩、提取和 PCR) 正常工作。首次以操作可采用该实验方法, 后续实验如果需要达到实验室质量标准, 也可以使用该实验方法。有关详细信息, 请联系 IDEXX 技术支持 (400-678-6682)。

### 提取实验方法

Water DNA/RNA 磁珠试剂盒 (98-0014719-00, WCOV2MAG) 用于纯化核酸, 包括污水浓缩物中的 SARS-CoV-2 RNA。其他提取或裂解方法也可以在经过实验室验证后使用。

### PCR 实验方法

#### 干燥样品的溶解

使用移液枪转移样品标签上标明的体积的 PCR 等级水, 将 SARS-CoV-2 混合物和阳性对照溶解。将样品在 18 至 26°C 下至少静置 10 分钟; 使用前充分混合并简单离心。一旦 SARS-CoV-2 混合物和阳性参照被溶解, 将其分成小的等份, 并将溶液冷冻保存。处理冷冻样品时, 在 18 至 26°C 下放置约 15 至 30 分钟解冻, 将样品轻轻混合, 然后简单离心, 将液体收集在离心管底部 (2,000  $\pm 1000$  RCF)。

## 质量控制

水中SARS-CoV-2 RT-PCR试剂盒中所提供的参照如下：

- PCR 阳性对照 (PC)：需要阳性模板对照来确认 PCR 板有效。每个PCR实验中都应包含阳性对照，并且对SARS CoV-2靶点的测试应呈阳性。在提取过程中可以不包括 PCR 阳性对照。
- PCR 阴性对照 (PCR 级水)：需要“无模板” (阴性) 对照来确认 PCR 板有效。PCR 等级水被用作阴性对照，并且阴性对照应包含在每次 PCR 实验中。阴性对照应在测试中于SARS CoV-2靶点呈阴性。

应有的参照样品，但在实验中不要求或水中SARS-CoV-2 RT-PCR 试剂盒中不提供的如下所示：

- 提取阳性参照 (ACCUplex SARS-CoV-2验证面板)：含有SARS-CoV-2RNA的提取参照物应在每组样品中被测试。提取阳性控制用于证明在提取过程中RNA的成功回收，并应进行测试。提取阳性参照被用于证明在提取过程中成功的回收了RNA并对SARS CoV-2 目标测试为阳性。IDEXX建议使用Acccuplex Verification Panel (参见订购信息)，其中包含一种重组病毒，该病毒被设计成含有SARS-CoV-2RNA序列；这提供了一个完整的提取过程参照物，需要从完整的病毒颗粒中裂解和回收单链RNA，以得到阳性结果。使用提取阳性参照物需要使用在样品提取的Verification Panel 中提供的200  $\mu$ L “Member 1” 稀释液。结果可由下表解释。
- 或者，已被确认含有SARS-CoV-2的样品可用于提取过程的阳性对照。此类样品应有足够的体积，可在多次批量实验中使用。需要在使用前对其进行测试，并对其适当稀释后使用，以确保获得预期的阳性结果。
- 提取过程阴性对照 (PCR级水)：每组污水样品应同时与不含有核酸的“无模板” (阴性) 对照进行提取实验，以证明提取试剂和材料中无核酸污染。提取过程阴性参照应给予对SARS CoV-2 靶点显示的阴性结果。可以在RNA提取过程中使用 200  $\mu$ L 的 PCR 级水作为阴性对照。

## PCR 测试步骤

### 1 准备PCR混合物。

- 通过上下颠倒或温和的涡旋混合解冻的RNA MMx。
- RNA MMx 是一种粘性溶液: 移液时应缓慢操作。
- 准备PCR混合物时, 在每个反应中添加10 $\mu$ L SARS-CoV-2混合物和10 $\mu$ L RNA MMx。包括所有对照实验所需试剂。
- 在准备PCR混合物时, 首先用移液枪将SARS-CoV-2混合物转移到离心管中, 然后加入RNA MMx。上下吹打液体几次, 以冲洗移液器枪头。
- 轻轻涡旋溶液, 确保各成分混合良好。

在 20 分钟内将PCR 板放入PCR设备中, 或将其在 2 至 8 $^{\circ}$ C 下存放最多 4 小时。PCR 混合物可在 -25 至 -15 $^{\circ}$ C下避光储存长达 2 周。

### 2 缓慢将 20 $\mu$ L 的 PCR 混合物用移液枪转移到多孔板指定的孔中。

### 3 对于每个污水样品, 在适当的孔中加入5 $\mu$ L的纯化RNA。最终反应体积为25 $\mu$ L。

### 4 对于每个对照反应, 在对应的反应孔中加入5 $\mu$ L反应物。最终反应量为 25 $\mu$ L。其中包括每次测试中的 PCR 阳性参照 (5 $\mu$ L PC)、PCR 阴性参照 (5 $\mu$ L PCR 等级水)、提取过程阳性参照 (5 $\mu$ L) 和提取过程阴性参照 (5 $\mu$ L)。

### 5 如有必要, 盖住多孔板并简单离心, 以沉淀内容物和清除气泡。

### 6 设置实时PCR仪器的循环程序如下。

#### 报告团和淬灭团的设置

目标	报告	淬灭
SARS-CoV-2	FAM <sup>TM</sup>	BHQ <sup>®</sup> (non)
参比染料	ROX <sup>TM</sup>	N/A

#### 循环程序 (用于所有仪器)

步骤	温度	时间	周期
逆转录 (RT)	50 $^{\circ}$ C	15 min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	1 min	1
扩增**	95 $^{\circ}$ C 60 $^{\circ}$ C	15 sec 30 sec	45

\*\*确保仪器在 60 $^{\circ}$ C 扩增步骤后记录荧光。

## 7 分析数据

在解释结果之前，应检查所有参照实验。如果参照实验无效，则无法解释结果。

为了获得适当的 Ct 值，应手动设置阈值，对 SARS CoV-2 目标进行分析。阈值应调整为曲线指数期的拐点和背景信号以上的位置。最好是在以对数比例查看给定运行的所有扩增曲线。在设置手动阈值时，必须遵循相同的过程运行。

有关如何分析数据的指导，请参阅特定工具的用户手册。

### 板有效性标准

在 PCR 实验中都需要获取以下参照实验结果，这样才能将实验视为有效。如果PCR板对照实验无效，则无法解释结果，无效，并且必须重复实验。

对照/样品	SARS-CoV-2 FAM Ct 值	SARS-CoV-2 FAM 结果
阳性参照	<40	阳性
PCR 阴性参照	无信号	阴性
提取阳性参照*	<40	阳性
提取阴性参照	无信号	阴性
污水样品	<40	阳性

样品有效性：在显示上表所述的预期参照结果的板上分析时，每个样品都被认为是有效的。阳性样本应显示特征放大曲线。

\*代表预期结果。

## 检测限制

### 8 限制

- 水中SARS-CoV-2 RT-PCR试剂盒的性能仅在初级污水样品的基础上建立。其它样品类型尚未被评估。
- 必须使用适当的步骤和条件收集、运输和储存样品。样品的不当收集、运输或存储可能会影响测试性能。
- 根据本说明所列特定方法，从污水样品中对核酸进行浓缩、提取和扩增，从而获得验证数据。其他浓缩、提取方法和操作系统尚未得到证实。
- 如果样品收集、运输或处理不当，则可能会出现假阴性结果。如果样品中存在扩增抑制剂，也可能发生假阴性结果。
- 如果病毒在测试目标区域发生变异，则SARS-CoV-2 RNA可能无法被检测到，或者可能小于预期检测结果。
- 样品处理、制备、核酸提取、PCR测定或产品处理过程中，可能会产生交叉污染引起的假阳性结果。

如需获得技术支持，请致电：400 678 6682

\*IDEXX 是 IDEXX 实验室或其在美国及其他国家/地区附属公司的商标或注册商标。所有其他产品和公司名称和徽标均为其各自所有者的商标。

©2020 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

06-0014720-00

## 符号描述

---

**LOT**

批号

**REF**

目录号



按日期使用



制造商

---