



新型冠状病毒 2019-nCoV 和流感 A/B 病毒核酸

联合检测试剂盒说明书

(仅用于科研)

【产品名称】

通用名称: 新型冠状病毒 2019-nCoV 和流感 A/B 核酸联合检测试剂盒 (四色荧光 PCR 法)

【包装规格】

50T/盒、100T/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测新型冠状病毒(2019-nCoV)感染的肺炎疑似病例、疑似聚集性病例患者、其他需要进行新型冠状病毒感染诊断或鉴别诊断者的鼻咽拭子、血清或血浆等样本中的新型冠状病毒 RNA, 同时检测样本中的流感病毒 A/B RNA 辅助排除疑似病例, 可用于对新型冠状病毒感染的鉴别诊断。

【检验原理】

本试剂盒通过实时荧光 PCR 扩增检测技术: 使用荧光标记的探针, 通过检测扩增过程中荧光报告基团发出的荧光强度, 实时监控 PCR 产物的数量。检测探针与内标探针均带有荧光报告基团和淬灭基团, 通过标记不同颜色的荧光基团来区分, 在不同的波长区独立检测。当探针为完整时, 荧光报告基团接近淬灭基团, 由于 Förster 能量转移效应, 荧光被抑制。PCR 扩增过程中, 探针与靶序列杂交, 并为 Taq DNA 聚合酶的 5' → 3' 核酸酶活性所切割。一旦荧光报告基团和淬灭基团分离, 淬灭作用被解除, 报告荧光增加。通过预设循环数, 每次有效循环均会导致报告基团的荧光强度的增加。扩增曲线开始指数增长时的 PCR 循环数与起始样本的模板数有关。

选取新型冠状病毒 2019-nCoV N 基因和 E 基因作为扩增靶区域, 设计特异性引物和荧光探针, 用 FAM 标记, 检测样本中是否含有新型冠状病毒 RNA。选取新型冠状病毒 ORF1ab 基因, 设计特异性引物和荧光探针, 用 ROX 标记, 检测样本中是否含有新型冠状病毒 RNA。选取流感病毒 A/B 特征性保守序列, 设计特异性引物和荧光探针, 用 Cy5 标记, 检测样本中是否含有流感病毒 A/B RNA。选取非人基因组非试剂盒检测靶标的其他物种序列设计内标引物探针, 用 VIC 标记, 在反应体系中加入内标引物探针, 用以监控整个实验流程。

同时, 在反应体系中加入 UNG 酶防污染体系, UNG 酶防污染体系的作用原理是选择性水解断裂含有 dU 的双链或单链 DNA 中的尿嘧啶糖苷键, 形成的有缺失碱基的 DNA 链, 在碱性介质以及高温下会进一步水解断裂, 从而消除 PCR 扩增产物的污染。

表 1 荧光信号及靶标

荧光信号	靶标
FAM	新型冠状病毒E基因和N基因
VIC	MS2内标 (RNA Phage 假病毒)
ROX	新型冠状病毒ORF1ab基因
Cy5	流感病毒A/B特征性序列



【主要组成成分】

表 2 试剂盒及组成成分

试剂名称	数量 (50 测试/盒)	数量 (100 测试/盒)
阴性对照	200 μ L \times 1 支	200 μ L \times 1 支
阳性对照	200 μ L \times 1 支	200 μ L \times 1 支
内标	50 μ L \times 1 支	100 μ L \times 1 支
RT-PCR 反应液	900 μ L \times 1 支	1800 μ L \times 1 支
酶混合物	150 μ L \times 1 支	300 μ L \times 1 支
新型冠状病毒引物探针	100 μ L \times 1 支	200 μ L \times 1 支
流感 A/B 引物探针	100 μ L \times 1 支	200 μ L \times 1 支

注：不同批号试剂盒中各组分不可互相混用。

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒于-20 \pm 5 $^{\circ}$ C避光保存，有效期暂定为 12 个月；
2. 试剂盒在运输过程中需以泡沫箱外加干冰进行运输，运输时间不超过 5 天；
3. 试剂盒开瓶使用完毕后于常规储存条件保存，不影响产品有效期，反复冻融次数建议不超过 10 次。
4. 生产日期、有效期至：见产品外包装盒。

【适用仪器】

荧光 PCR 扩增仪：具备四色或多色检测功能的荧光 PCR 扩增仪（推荐使用 ABI PRISM@7500、Bio-rad CFX 96、SLAN）。

【样本要求】

1. 样本类型：
上呼吸道样本：鼻咽拭子样本、鼻咽抽取物。
下呼吸道样本：深咳痰液、呼吸道抽取物、支气管灌洗液、肺泡灌洗液、肺组织活检标本。
其他样本：血清或血浆样本。
2. 血清样本：样本采血管应使用无菌采血管。采集后的样本需及时送检，24 小时内检测可于 2~8 $^{\circ}$ C 保存；超过 24 小时的建议-70 $^{\circ}$ C 以下保存，避免反复冻融。
3. 咽拭子样本：用 2 根聚丙烯纤维头的塑料杆拭子同时擦拭双侧咽扁桃体及咽后壁，将拭子头浸入含 3ml 病毒保存液（也可使用等渗盐溶液、组织培养液或磷酸盐缓冲液）的管中，尾部弃去，旋紧管盖。采集后的样本需及时送检，或保存于-20 \pm 5 $^{\circ}$ C 待检，保存期不超过 4 个月，避免反复冻融。
4. 鼻拭子样本：将 1 根聚丙烯纤维头的塑料杆拭子轻轻插入鼻腔内鼻腭处，停留片刻后缓慢转动退出。取另一根聚丙烯纤维头的塑料杆拭子以同样的方法采集另一侧鼻孔。上述两根拭子浸入同一含 3ml 采样液的管中，尾部弃去，旋紧管盖。采集后的样本需及时送检，或保存于-20 \pm 5 $^{\circ}$ C 待检，保存期不超过 4 个月，避免反复冻融。
5. 鼻咽抽取物或呼吸道抽取物：用与负压泵相连的收集器从鼻咽部抽取粘液或从气管抽取呼吸道分泌物。将收集器头部插入鼻腔或气管，接通负压，旋转收集器头部并缓慢退出，收集抽取的粘液，并用 3ml 采样液冲洗收集器 1 次（亦可用小儿导尿管接在 50ml 注射器上来替代收集器）。
6. 深咳痰液：要求病人深咳后，将咳出的痰液收集于含 3ml 采样液的 50ml 螺口塑料管中。
7. 支气管灌洗液：将收集器头部从鼻孔或气管插口处插入气管（约 30cm 深处），注入 5ml 生理盐水，接通负压，旋转收集器头部并缓慢退出。收集抽取的粘液，并用采样液冲洗收集器 1 次（亦可用小儿导尿管接在 50ml 注射器上来替代收集）。
8. 肺泡灌洗液：局部麻醉后将纤维支气管镜通过口或鼻经过咽部插入右肺中叶或左肺舌段的支管，将其顶端契

Add: Floor 2, Gate 6, 289#, Minqiang Road, Songjiang District, Shanghai 201612

Tel: +86-21-54460832

Fax: +86-21-54460831

Web: www.synthesisgene.com

E-mail: master@shinegene.org.cn



入支气管 分支开口，经气管活检孔缓缓加入灭菌生理盐水，每次 30~50 ml，总量 100~250ml，不应超过 300ml。

9. 样本处理、保存、运输和 RNA 提取亦可参照国家标准、卫健委有关文件（推荐《新型冠状病毒感染的肺炎防控方案》）或有关行业标准中推荐的方法。

【检验方法】

1 样本处理

1.1 内标按照 1 μ L/人份加入样本裂解液。如果只监控 RT-PCR 过程，则取 0.5 μ L/人份加入抽提好的 RNA 中。

1.2 采用另购的核酸提取试剂盒进行样本核酸的提取和纯化，阳性对照、阴性对照无需进行核酸提取，直接进行核酸检测；

2 扩增检测

2.1 根据待扩增样本数（含阳性对照和阴性对照）按以下比例分别配制 PCR 反应液，并分装至 PCR 反应管（板）中，分装体积为 12.5 μ L。

组分名称	体积 (μ L)
RT-PCR 反应液	9
酶混合物	1.5
新型冠状病毒引物探针	1
流感 A/B 引物探针	1
总体积	12.5

2.2 分别加入 12.5 μ L 模板、阴性对照和阳性对照，盖上管盖（若为 PCR 反应板则封膜），在室温（15 $^{\circ}$ C -25 $^{\circ}$ C）放置 5 分钟后转移到扩增检测区；

2.3 将 PCR 反应管（板）放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。

2.4 扩增检测参数设定：

步骤	温度	时间	循环数	
1	50 $^{\circ}$ C	10min	1	
2	95 $^{\circ}$ C	2min	1	
3	变性	95 $^{\circ}$ C	5s	45
	退火、延伸及荧光检测	60 $^{\circ}$ C	35s	

步骤3中60 $^{\circ}$ C时荧光检测，新型冠状病毒E基因和N基因检测通道为FAM，新型冠状病毒ORF1ab基因检测通道为ROX，内标检测通道为VIC，流感病毒A/B检测通道为CY5。

3 结果分析

3.1 扩增曲线特征的描述：扩增曲线一般呈 S 型，可分为基线期、指数增长期、线性增长期和平台期，示例如图 2。

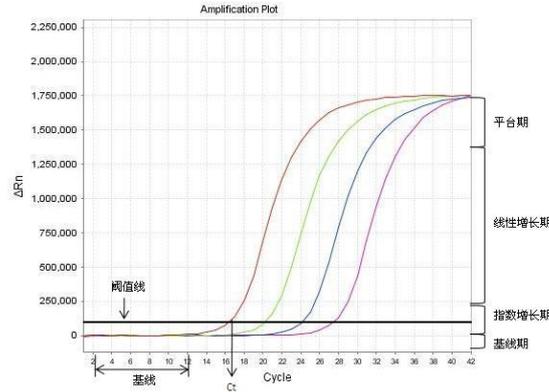


图2 扩增曲线分析

- 3.2 基线 (Baseline) 设定: 根据实验情况, 选择荧光本底值较稳定的一段区域作为基线的设定范围。
- 3.3 阈值 (Threshold) 设定: ΔRn (校正后报告荧光强度) 的一个值, 由软件自动确定或手动设置, 用于在实验分析中确定 Ct 值。阈值设置应高于基线, 且控制在扩增曲线的指数增长阶段范围内。一般以超过阴性对照品扩增曲线的最高点为准。
- 3.4 Ct 值 (Cycle-threshold): 阈值线与扩增曲线的交叉点确定 Ct 值。

注: 根据各类荧光 PCR 仪器的软件进行分析, 得到各样本的检测结果。(建议基线选取 6~15 或 9~25 个循环 (或根据不同仪器、样本检测的具体情况设置基线, 阈值线选在阴性对照正常扩增曲线的上方)。

【参考值 (参考范围)】

经对阴性样本和接近最低检测限样本的检测, 确定本试剂盒目的基因 (FAM通道) 检测结果的参考值为36.5, 目的基因 (ROX通道) 检测结果的参考值为38。

【检验结果的解释】

1. 阴性对照 (NC) 的检测结果应为新型冠状病毒、流感病毒均阴性且内标阳性, 若否, 则此次检测结果无效, 提示存实验操作或环境在核酸污染。
2. 阳性对照 (PC) 的检测结果应为新型冠状病毒、流感病毒阳性, 若否, 则此次检测结果无效。
3. 待测样本的检测结果根据表4进行判定:

表4 检测结果判定方法

结果判定	Ct 值	建议或提示
判定为新型冠状病毒阳性的情形	Ct (FAM) \leq 36.5 且 Ct (ROX) \leq 38	
判定为新型冠状病毒阴性的情形	Ct (FAM、ROX) \geq 39 或无数值, 且 Ct (VIC) $<$ 40	
需要进行复测的情形 (最终判定结果以复测结果为准)	1、仅 Ct (FAM) \leq 36.5 或 Ct (ROX) \leq 38	建议重新提取核酸后复测, 复测后 Ct (FAM) \leq 36.5 或 Ct (ROX) \leq 38, 判为阳性。
	2、36.5 $<$ Ct (FAM) $<$ 39 或 38 $<$ Ct (ROX) $<$ 39	建议加大样本量浓缩后进行复测, 若复测结果中 Ct (FAM) $<$ 39 且 Ct (ROX) $<$ 39, 判定为新型冠状病毒阳性; 其他情况建议采用另一方法进行确认。
	3、Ct (FAM、ROX、CY5) \geq 39 或无数值, 且 Ct (VIC) \geq 40 或无数值	提示实验操作、试剂可能存在问题, 建议明确原因后进行复测。
其他情形	Ct (CY5) $<$ 40	提示存在流感病毒 A/B 感染或合并感染。



【检验方法的局限性】

1. 阴性结果不能完全排除靶基因的存在，样本中病毒含量过低，样本降解、样本污染、样本中存在过量干扰物质、不正确的样本保存、不正确的试剂盒保存、试剂盒过期等亦可能产生阴性检测结果。
2. 本试剂盒主要针对血清、鼻咽拭子样本中的核酸的定性检测，结果不能反应原始样本中病毒核酸含量。
3. 本试剂盒检测的靶序列在各毒株间都是高度保守且较稳定，但如果在靶序列处发生基因突变，则有可能造成假阴性结果。
4. 低于检测限的样本可能无法检出，故检测结果不作为临床诊断或排除病例的唯一依据，对患者的临床诊治应结合其症状、体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
5. 核酸检测从理论上并不能完全检测出“窗口期”感染。
6. 该检测仅限于规定的样本类型及检测系统。
7. 本试剂盒检测结果与临床诊断结论不一致时，建议对检验结果进行复检，并最终临床诊断结论为准。

【产品性能指标】

1. 外观
试剂盒应清洁、标识清晰无破损、各组分标签无错误或脱落；各组分封存良好无漏液。试剂均为透明状液体，无肉眼可见的固体悬浮物或沉淀物。
2. 准确性
对国家阳性参考品或企业阳性参考品进行检测，检测结果应为阳性，阳性参考品符合率为100%。
3. 特异性
对国家阴性参考品或企业阴性参考品进行检测，检测结果应皆为阴性，阴性参考品符合率为100%。
4. 最低检测限
对国家最低检测限参考品或企业最低检测限参考品（10 copies）进行检测，重复3次，检测结果均为阳性。
5. 重复性
对国家重复性参考品或企业重复性参考品进行检测，重复10次，检测结果均为阳性，且Ct值的CV≤5%。
6. 抗干扰
不受干扰素、鼻腔喷雾剂、滴鼻液、类固醇、黏蛋白、扎那米韦、利巴韦林、奥司他韦、帕拉米韦、莫匹罗星、妥布霉素、血红蛋白、甘油三脂、乙醇等干扰物影响。
7. 交叉反应
不与人细胞系gDNA、地方性人类冠状病毒HKU1、OC43、NL63、229E、甲型流感病毒H1N1、H3N2、乙型流感病毒出现交叉反应。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外伴随诊断，使用前请仔细阅读本说明书，并确定已准备相应试剂及仪器。
2. 本产品仅供专业人员做体外诊断使用。
3. 本试剂盒结果会受到样本本身的来源、样本采集过程、样本质量、样本运输条件、样本预处理等因素影响，同时也受到样本DNA提取质量、操作环境以及当前分子生物学技术的局限性等限制，导致可能得出假阳性或假阴性的检测结果。使用者须了解检测过程中可能存在的潜在风险及检测的局限性。
4. 本试剂盒各组分均经过特别配制，随意替换试剂盒组分可能影响检测结果。不同批号试剂盒各个组分不可相互替换使用。



5. 产品开封后贮存条件不变，避免试剂不必要情况的反复冻融。
6. 所有的试剂都具有潜在的危险性，只有经过培训且具有相应实验室技术的专业人员才能使用本试剂盒。样本操作和处理需符合相应法规要求：卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。同时严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》（卫办医政发〔2010〕194号或现行有效版本）等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。
7. 实验时注意防止外源DNA对试剂的污染，在操作过程中使用单独、专用的移液器和滤芯吸头。
8. 样本的检测结果仅供临床参考，对患者个体化治疗的选择应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
9. 实验后的废弃物品，如吸头、扩增产物等需进行无害化处理后方可丢弃。
10. 实验完毕后使用10%次氯酸或75%乙醇处理操作台面和移液器、离心机等仪器表面，然后紫外灯照射25~30分钟。

本试剂盒的主要特点：

1. 灵敏度高 10 拷贝/ml
2. 特异性强，可同时检测 2019-nCoV 的 E、N、ORF1ab 3 个不同区的基因序列，避免因突变造成的漏诊。
3. 可同时鉴定、区分流感病毒，避免不必要的误诊。
4. 一步法 RT-PCR，扩增信号强；稳定性高。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市松江区新桥镇民强路 289 号 6 号门 2 楼

邮编：201612

联系：市场部

电话：021-54460832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

