

Code No. RR250A

研究用

TaKaRa

TaKaRa qPCR *Norovirus*

(GI/GII) Typing Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	2
● 保 存	2
● 试剂盒外所需仪器及试剂	2
● 使用注意事项	3
● 操作注意事项	3
● 使用 GI & GII Positive Control DNA 进行定量分析	4
● 操作流程	4
● 结果判定时的注意事项	12
● 参考文献	13
● 关联产品	13

● 制品说明

诺如病毒 (NoV) 是引发急性胃肠炎的一种病毒。感染源主要来自感染者的排泄物 (粪便、呕吐物) 或带有诺如病毒的双贝壳类 (牡蛎等)。被感染者经数日的潜伏期后出现呕吐、腹泻、腹痛、发热 (37-38℃) 等症状。

诺如病毒属于杯状病毒, 其表面覆盖一层帽状的有凹痕的蛋白质, 基因组为单股正链 RNA。目前, 组织培养法等难以分离和检测诺如病毒, 因此, 利用 RT-PCR 法及 Real Time PCR 进行病毒的检测和诊断。

诺如病毒被分为 genogroup I-V 5 种基因型, 人类主要感染 genogroup I (GI) 型和 genogroup II (GII) 型。本制品是使用 GI 和 GII 检测用引物与探针进行 Real Time PCR 检测诺如病毒的试剂盒。制品中使用的引物和探针碱基序列与日本厚生劳动省 医药食品局 食品安全部 监视安全科下达的通知[有关诺如病毒检测方法] (食安监发第 1105001 号) (最终修订: 2013 年 10 月 22 日食安监发 1022 第 1 号) (以下简称公定法) 中记载的碱基序列相同。

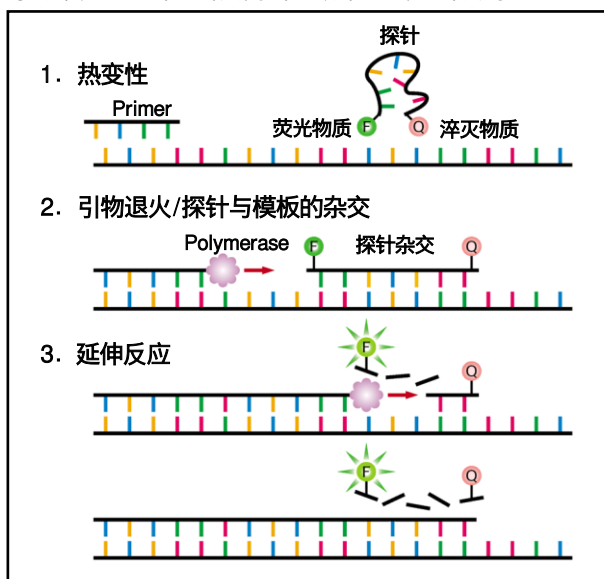
利用荧光物质的 Real Time PCR 检测方法因其简便性、快速性、高特异性, 近年来用于食品中包括诺如病毒等各种病原体的检测。

制品中使用的 *TaKaRa Ex Taq*[®] HS 是含抗 *Taq* 抗体的 Hot Strat 型 DNA 聚合酶, 与适宜 Buffer 组合使用, 可以在短时间内进行高效扩增、高灵敏度的检出, 并能有效防止在热循环前由引物错配或引物二聚体产生的非特异性扩增。本制品适用于反应时间短的快速 PCR, 在宽广的动态范围内可准确对检测样品基因进行检出和定量, 同时还可以进行重复性好、可信度高的 Real Time PCR 解析。

探针法是使用 5' 端带有荧光物质 (FAM 等), 3' 端带有淬灭物质 (TAMRA 等) 的探针进行荧光检测的方法。当探针完整时, 5' 端的荧光物质受到 3' 端的荧光物质的制约, 不能发出荧光。而当探针被分解后, 5' 端的荧光物质便会游离出来, 发出荧光。

当 PCR 反应液中加入荧光探针后, 在 PCR 反应的退火过程中, 荧光探针便会和模板杂交。进一步在 PCR 反应的延伸过程中, *Taq* DNA 聚合酶的 5' → 3' Exonuclease 活性可以分解与模板杂交的荧光探针, 游离荧光物质发出荧光。通过检测反应体系中的荧光强度, 可以达到检测 PCR 产物扩增量的目的。

本制品是在与群马县环境卫生研究所共同研究成果基础上研发的。



探针法技术原理图

● 制品内容 (RT 反应 50 次量、GI 反应 50 次量*1、GII 反应 50 次量*1)

1. 5X PrimeScript™ Buffer (NV) *2、3	200 μl
2. PrimeScript RT Enzyme Mix (NV) *2、4	50 μl
3. Random 6 mers (100 μM) *2	50 μl
4. <i>Premix Ex Taq</i> (NV) (2X conc.) *5	625 μl×2
5. GI Primer Mix *6	50 μl
6. GII Primer Mix *6	50 μl
7. GI Probe Mix *6、7	50 μl
8. GII Probe Mix *6、7	50 μl
9. ROX Reference Dye (50X conc.) *8	50 μl
10. ROX Reference Dye II (50X conc.) *8	50 μl
11. RNase Free dH ₂ O	1 ml
12. GI Positive Control DNA *9 (4×10 ⁶ copies/μl)	20 μl
13. GII Positive Control DNA *9 (4×10 ⁶ copies/μl)	20 μl
14. EASY Dilution (for Real Time PCR) *10	700 μl

*1: 本制品以 8 个浓度梯度 (n=3) 制作标准曲线, 对检测样品和阴性对照进行 (n=2) 平行检测时, 可对 12 个检测样品进行检测。

*2: 反转录反应应用试剂。

*3: 含有 dNTP Mixture 及 Mg²⁺。

*4: 含有 RNase Inhibitor。

*5: 含有 *TaKaRa Ex Taq* HS, dNTP Mixture 和 Mg²⁺。

*6: 碱基序列采用公定法中记载的碱基序列。

*7: 含有荧光标记探针, 应避光保存。

*8: 用于 Thermo Fisher Scientific 的 Real Time PCR 扩增仪, 用以校正孔与孔之间的荧光信号误差。

◆ 使用 ROX Reference Dye 的 PCR 仪

· Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

◆ 使用 ROX Reference Dye II 的 PCR 仪

· Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

◆ 不使用 ROX Reference Dye 或 ROX Reference Dye II 的 PCR 仪

· Thermal Cycler Dice Real Time System // (Code No. TP900/TP960: 终卖)

*9: 用于制作标准曲线的标准品。阳性对照是质粒 DNA, 不需要进行反转录反应。使用方法可与公定法中 GI、GII 阳性质粒 DNA 的使用方法相同。

注意: 反复冻融会影响 PCR 反应的定量。

*10: Positive Control DNA 梯度稀释时使用的稀释液。

● 保存: -20℃保存

Premix Ex Taq (NV) (2X conc.) 融解后 4℃保存, 6 个月内性能稳定。

长期保存时, 请于-20℃保存。

制品开封后, 为避免 Positive Control DNA 污染其它试剂, 请将 12.和 13.组份分开保存。

● 试剂盒外所需仪器及试剂

【试剂】

RNA 提取试剂

【器具】

- 200 μ l、20 μ l、10 μ l 移液枪
- 移液枪专用枪头（带有疏水滤膜）

【仪器】

Real Time PCR 仪及专用反应管

- Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC (Code No. TP970)
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760: 终卖)
- Thermal cycler Dice Real Time system // (Code No. TP900/TP960: 终卖)

下面是适用于 Thermal Cycler Dice Real Time System Series 的反应管。

为了降低反应管间的交叉污染，建议使用下述反应管。

0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (Code No. NJ902)

0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (Code No. NJ600)

- Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) , etc.

● 使用注意事项

下面是使用本制品时的注意事项，使用前请务必阅读

1. 使用目的：本试剂盒是用于环境分析及食品分析的制品。
2. 检测结果：本制品用于基因检测，即使是死的病毒也可检测出来。（检测结果判定发生问题时，本公司概不负责）。
3. 废弃：检测样品具有感染性，请按照各设施的安全规定进行妥善处理。操作区要保持清洁，要穿实验服，戴口罩、手套和护目镜等。如有需要对检测样品和使用器材进行 121℃、20 分钟的高压灭菌或 2.5%次氯酸钠处理后，再按照各设施的污染性废弃物处理条例进行处理。试剂废弃时，请用大量流水冲洗。塑料容器等实验器具请按照各自的废弃物处理及清扫相关条例进行处理。

● 操作注意事项

1. PrimeScript RT Enzyme Mix (NV) 使用前轻离心，使试剂至管底。酶中含有 50%甘油，黏度高，应缓慢吸取。
2. 分装试剂时，一定要使用新的一次性反应管，防止样品间污染。
3. 如果样品、杂合探针和引物因混入核酸酶而被降解，则不能准确进行检测。实验者的汗液和唾液也会带入核酸酶，操作时应戴一次性手套和口罩。
4. *Premix Ex Taq* (NV) 含有 PCR 酶，使用时请上下颠倒轻轻均匀混合，防止产生气泡，防止因混合不均匀造成的反应不良。

Premix Ex Taq (NV) 在-20℃存放可能会产生沉淀，可用手掌温度缓慢溶解或于室温放置，轻柔的上下颠倒混匀直至沉淀全部消失。沉淀会导致溶液成分不均一，使用前务必充分混匀试剂。

5. PCR 反应是灵敏度非常高的反应。为防止污染，建议从反应液的配制到检测的实验过程中，设定以下 3 个实验区域，并进行物理性隔离。
 1. 区域 1：反应液的配制及分装。
 2. 区域 2：检测样品的制备。
 3. 区域 3：向反应液中添加检测样品，进行反应、检出。

由于本制品使用 Real Time PCR 法，扩增反应与检测同时进行，反应后的扩增产物不需要再进行电泳。为了避免污染，严禁从 Tube 管中取出扩增产物。

6. Real Time PCR 仪的使用请按照仪器的说明书进行操作。
7. 使用本制品获得的结果是以 Real Time PCR 仪的分析为基础来判定的。如果 Real Time PCR 仪的任何 Auto 功能出现问题都可能导致错误的判定结果，因此要依据仪器说明书来正确设置 Real Time PCR

仪。

8. 对应的引物和探针不能检测出发生新的变异的诺如病毒。

● 使用GI和GII Positive Control DNA进行定量分析

试剂盒中附带的GI Positive Control DNA和GII Positive Control DNA是Takara Bio合成的含诺如病毒碱基序列的质粒DNA。

为了获得与公式法中相同的定量结果，调整了GI Positive Control DNA和GII Positive Control DNA的浓度，因此使用方法可与公式法相同。

使用EASY Dilution (for Real Time PCR) 10倍梯度稀释GI Positive Control DNA和GII Positive Control DNA后制作标准曲线，并根据标准曲线进行定量分析。定量范围可根据检测结果进行判断。阳性对照反复冻融会影响其定量性。

● 操作流程

<使用 Positive Control DNA 进行定量分析>

操作概要

1. 样品制备
2. 反转录反应
3. Real Time PCR仪的设置
4. 反应液的配制及开始反应

将GI Positive Control DNA和GII Positive Control DNA梯度稀释，制备标准曲线用标准品

↓

配制反应液

↓

将反应液分装到反应管中，添加阴性对照（灭菌水）、标准曲线用标准品和检测样品

↓

将反应管放入Real Time PCR仪中，开始反应

↓

5. 结果判定

↓

界面显示Real Time PCR扩增曲线

↓

反应完成

↓

从标准曲线可以计算出检测样品的拷贝数。

- A. 样品的制备（在区域2进行）

取患者粪便时要在生物安全柜内操作，要注意防止污染。

制备核酸（特别是RNA）时，为防止实验者的汗液及唾液中核酸酶的混入，应戴一次性口罩和手套，设置RNA专用实验区。

实验器具尽可能使用一次性塑料制品，建议使用RNase-OFF[®]（Code No. 9037）擦拭实验台和实验器具以去除RNase。另外，RNA用实验器具（塑料和玻璃制品）应专用，与其他实验器具分开使用。请按照公定法中记载的方法，从粪便等检测样品中制备RNA样品。

- B. 反转录反应

（1）按下列组份在冰上配制PCR反应液（在区域1进行）。

将下列组份除RNA样品外配成所需管数+ α 的混合液后，向每个0.2 ml反应管中添加10 μ l混合液。

试剂	使用量
5X PrimeScript Buffer (NV)	4 μ l
PrimeScript RT Enzyme Mix (NV)	1 μ l
Random 6 mers (100 μ M)	1 μ l
RNA样品	10 μ l
RNase Free dH ₂ O	4 μ l
Total	20 μ l

(2) 添加RNA样品后, 按照下面的反应条件进行反转录反应 (在区域3进行)。

使用Thermal Cycler非常便利。

37°C 15 min(反转录反应)

85°C 5 sec (使反转录酶热失活)

4°C

反应结束后, 反转录反应液可-20°C冷冻保存。

C. 标准曲线用标准品的配制 (在区域3进行)

请分别制备GI和GII标准品。

(1) 将45 μ l EASY Dilution分装于7管1.5 ml Tube中。

(2) 将20 μ l GI Positive Control DNA和20 μ l GII Positive Control DNA分别移至0.2 ml Tube中。

(3) 98°C热处理 (2) 的GI或GII Positive Control DNA后, 将0.2 ml Tube快速置于冰中冷却。

(4) 将热处理后的5 μ l Positive Control DNA (4×10^6 copies/ μ l) 加入到 (1) 的Tube中, 配制成 4×10^5 copies/ μ l。

(5) 梯度稀释至 4×10^{-1} copies/ μ l, 最终浓度分别为 4×10^{-1} copies/ μ l~ 4×10^6 copies/ μ l

1. 4×10^6 copies/ μ l (GI or GII Positive Control DNA原液)

2. 4×10^5 copies/ μ l (GI or GII Positive Control DNA原液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)

3. 4×10^4 copies/ μ l (4×10^5 copies/ μ l溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)

4. 4×10^3 copies/ μ l (4×10^4 copies/ μ l溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)

5. 4×10^2 copies/ μ l (4×10^3 copies/ μ l溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)

6. 4×10^1 copies/ μ l (4×10^2 copies/ μ l溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)

7. 4×10^0 copies/ μ l (4×10^1 copies/ μ l溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)

8. 4×10^{-1} copies/ μ l (4×10^0 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)

* 使用8个梯度的DNA溶液制作标准曲线。

(一个反应分别使用2.5 μ l, 建议进行n=3的平行反应)

D. Real Time PCR反应液的配制及开始反应

使用本试剂盒除Positive Control DNA的标准曲线制作外, 还应该同时进行检测样品反应和阴性对照反应。

(1) 按下列组份在冰上配制PCR反应液 (在区域1进行)。

分别配制GI和GII反应液

将下列组份除模板外配成所需管数+ α 的混合液后, 向每个0.2 ml反应管中添加22.5 μ l混合液, 轻轻盖上盖子。所需管数=检测样品数+标准曲线用标准品数+阴性对照 (建议检测样品数及阴性对照为n=2以上, 标准曲线用标准品数 (8个浓度梯度) 为n=3)。其中作为阴性对照的反应管中加2.5 μ l灭菌水后, 盖紧盖子。

试剂	使用量	终浓度
Premix Ex Taq (NV) (2X conc.)	12.5 μ l	1X
GI或GII Primer Mix	1 μ l	
GI或GII Probe Mix	1 μ l	
ROX Reference Dye* ¹ 或ROX Reference Dye II* ¹ 或灭菌水	0.5 μ l	
cDNA样品* ² 或标准品* ² 或灭菌水(阴性对照)	2.5 μ l	
灭菌水	7.5 μ l	
Total	25 μ l	

*1: StepOnePlus Real-Time PCR System使用ROX Reference Dye、7500 Fast Real-Time PCR System使用ROX Reference Dye II。

Thermal Cycler Dice Real Time System // 添加dH₂O。

*2: cDNA样品及标准品在区域3添加,不在区域1添加。

[注意] 不要直接用手触摸反应管表面,以免影响荧光信号的收集。

(2) 样品(模板)的添加(在区域3进行)。

向除阴性对照以外的反应管中分别加入2.5 μ l cDNA样品和标准品,盖紧盖子。用小型离心机轻微离心,放置于Real Time PCR仪上。

[注意] 反应混合液配置好后应于1小时内进行反应。

E. 使用Real Time PCR仪进行扩增反应和定量分析(在区域3进行)。

各种Real Time PCR仪的操作方法有所不同。详细操作方法请参照其说明书。以下介绍使用Thermal Cycler Dice Real Time System // (Takara Bio) 及Applied Biosystem 7500 Fast Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) 时的操作方法及结果判定。

使用Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System时请参考第9页。

【使用Thermal Cycler Dice Real Time System //】

绝对定量 实验例

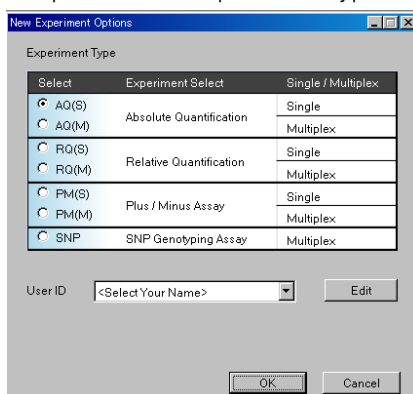
按照公定法,分别使用以下样品进行GI和GII反应。

标准曲线用标准品: 1 copy~ 1×10^7 copies (n=3)

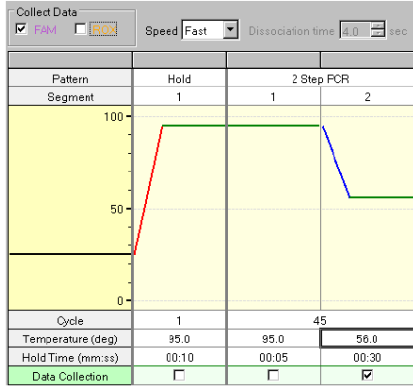
检测样品及阴性对照 (n=3)

标准曲线用标准品使用其对应的反应体系,检测样品及阴性对照分别使用GI和GII的2个反应体系进行检测。

(1) 创建一个新的运行文件,在New Experiment Options窗口的Experiment Type栏中选择“AQ(s), Absolute Quantification, Single”。



(2) 在Thermal Profile Setup界面下、Collect Data栏中选择“FAM”，按以下PCR条件进行设定。



预变性 (Hold)

Cycle: 1
95°C 10 sec

2 Step PCR

Cycles: 45
95°C 5 sec
56°C 30 sec (检测)

默认设定值的变更方法

双击后直接输入数值或按照箭头进行数值的变更。

变更项目	变更点
Hold	95°C、30 sec 变更为10 sec
2 Step PCR	60°C变更为56°C
循环圈数	40 cycles 变更为45 cycles

(3) 点击画面右下方的“Start Run”键，开始反应。



(4) 在Plate Setup界面下设定样品信息。在“Target List”和“Sample List”处输入样品信息。

1) “Target List”设定:

设定检测通道和样品名称

1. 点击“Add”，可在列表中增加一栏，点击“Delete”，可在列表中减少一栏。
2. 在“Dye”的下拉菜单中选择“FAM”。
3. 在“Name”输入样品名称“GI or GII”。
4. 如果需要，可选择颜色。

2) “Sample List”设定:

1. 选择所要设定的“well”，从下拉菜单中选择“Sample type”。
NTC [No Template Control]: 无模板的阴性对照
STD [Standard]: 制作标准曲线用标准品
NAC [No Amplification Control]: 不添加酶的阴性对照
UNKN [Unknown]: 未知检测样品

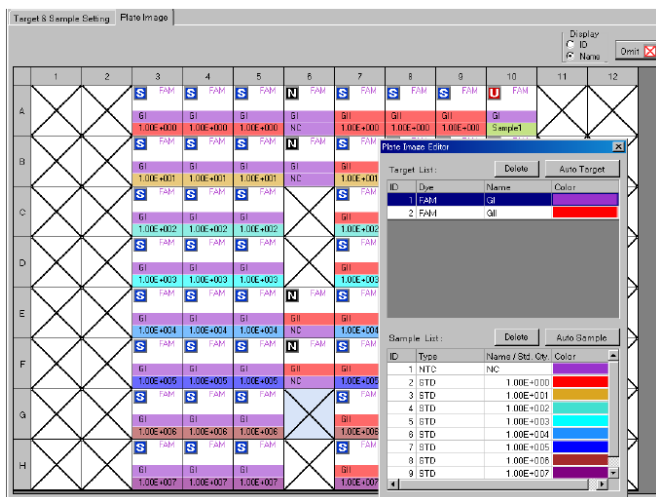
2. 在“Name”处添加样品名。

3. 如果需要，可选择颜色。

3) 点击“Update”键。

4) “plate Image”的设定

1. 在“plate Image”界面，待测孔位从“Plate Image Editor”选择“Target”。
2. 从“Plate Image Editor”选择“Sample”。
3. 未占用孔位选择“omit”。



(5) 结果分析。

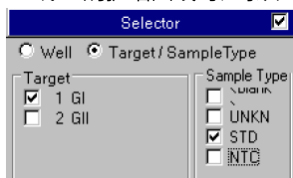
反应结束后，在Result/Analysis界面下确认结果。

1) 确认扩增曲线

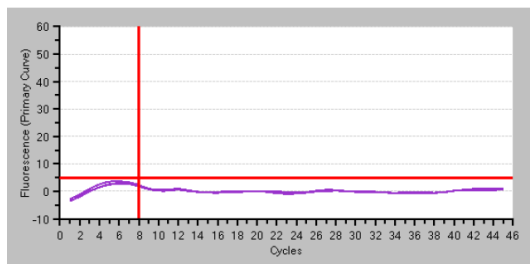
检测通道选择FAM，确认NTC（阴性对照）、STD（Positive Control DNA）的扩增曲线。

确认GI和GII的扩增曲线。

显示GI或GII的扩增曲线时，可从“Selector”直接选择待测孔位或从“Target/Sample Type”选择。



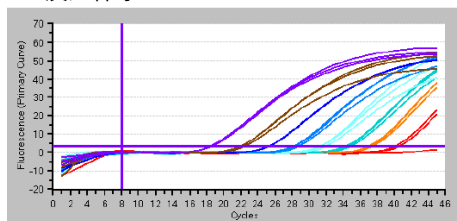
1. NTC扩增曲线确认：在“Selector”处选择<NTC>



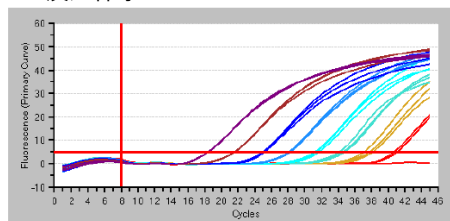
阴性对照在FAM通道中的荧光信号值不能超过阈值。

2. 阳性对照扩增曲线确认：在“Selector”处选择<STD>

GI反应体系



GII反应体系



确保阳性对照在FAM通道和ROX通道都应得到一条超过阈值的扩增曲线。

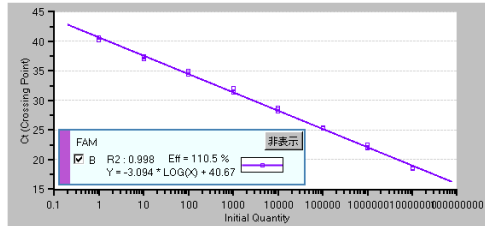
注意：1 copy的扩增曲线有时会不超过阈值。

3. 在“selector”处选择<UNKN>显示结果，确认检测样品的扩增曲线。

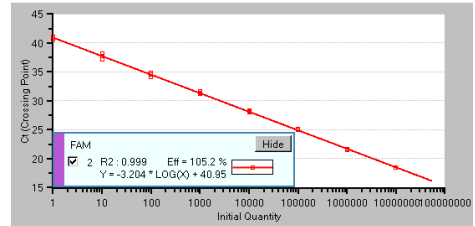
2) 标准曲线确认

在“Result/Analysis”的下拉菜单中选择“Standard Curve”。分别确认GI和GII的标准曲线。

GI标准曲线



GII标准曲线



如果需要，将标准曲线以外的反应孔进行“omit”设定。

1. 在“Selector”处选择要进行“omit”设定的反应孔。
2. 点击右键，选择Omit → Set，解析时可将所选的反应孔排除。
选择Omit → Reset，所选的反应孔可重新进行解析。

(6) 结果表示

在“Text Report”处显示

- 1) 在Analysis Data栏选择“Text Report”会显示text report。
- 2) 在“Selector”处选择反应孔。
- 3) 在“Data Set”处选择显示的Data Set。

Data Set of Each Well: 每个孔的分析结果

Data Set of Replicate: 重复性（靶基因与检测样品为同一组时）的解析结果（平均值或标准偏差）

Select all: 表示全部分析结果

- 4) 点击确认栏下面的“Show Items”，选择所需要的项目。

Analysis Setting: 相关的分析参数

CP method data: Crossing Point法结果分析

SDM Method Data : 2nd Derivative Maximum法结果分析

- 5) 在各项目的确认栏中可进行显示/非显示的变更
- 6) 点击text report的项目，所选择的项目就会自动分类。

表示例) GI反应体系的标准曲线用标准品和检测样品

Sample Type	Target Name	Sample ID	Sample Name	Ct(CP)	Ct Avg.(CP)	Init Qty	Qty(CP)	Qty Avg.(CP)
NTC	GI	1		—	—	—	—	—
NTC	GI	1		—	—	—	—	—
STD	GI	2		40.21	40.45	1.000E+000	1.451E+000	1.237E+000
STD	GI	2		—	40.45	1.000E+000	—	1.237E+000
STD	GI	2		40.68	40.45	1.000E+000	1.023E+000	1.237E+000
STD	GI	3		37.07	37.30	1.000E+001	1.501E+001	1.275E+001
STD	GI	3		37.55	37.30	1.000E+001	1.050E+001	1.275E+001
STD	GI	3		37.29	37.30	1.000E+001	1.275E+001	1.275E+001
STD	GI	4		34.70	34.71	1.000E+002	8.759E+001	8.817E+001
STD	GI	4		35.02	34.71	1.000E+002	6.903E+001	8.817E+001
STD	GI	4		34.42	34.71	1.000E+002	1.079E+002	8.817E+001
STD	GI	5		31.47	31.68	1.000E+003	9.692E+002	8.492E+002
STD	GI	5		32.11	31.68	1.000E+003	6.020E+002	8.492E+002
STD	GI	5		31.46	31.68	1.000E+003	9.765E+002	8.492E+002
STD	GI	6		28.45	28.53	1.000E+004	9.173E+003	8.785E+003
STD	GI	6		28.87	28.53	1.000E+004	6.711E+003	8.785E+003
STD	GI	6		28.28	28.53	1.000E+004	1.041E+004	8.785E+003
STD	GI	7		25.43	25.41	1.000E+005	6.681E+004	8.792E+004
STD	GI	7		25.44	25.41	1.000E+005	8.617E+004	8.792E+004
STD	GI	7		25.37	25.41	1.000E+005	9.078E+004	8.792E+004
STD	GI	8		22.06	22.25	1.000E+006	1.066E+006	9.409E+005
STD	GI	8		22.57	22.25	1.000E+006	7.294E+005	9.409E+005
STD	GI	8		22.11	22.25	1.000E+006	1.027E+006	9.409E+005
STD	GI	9		18.59	18.60	1.000E+007	1.410E+007	1.398E+007
STD	GI	9		18.69	18.60	1.000E+007	1.309E+007	1.398E+007
STD	GI	9		18.53	18.60	1.000E+007	1.475E+007	1.398E+007
UNKN	GI	10	Sample1	25.04	25.04	—	1.160E+005	1.160E+005
UNKN	GI	10	Sample1	25.04	25.04	—	1.160E+005	1.160E+005

在GI反应中，1 copy的标准曲线用标准品n=3检测时，有2个样品检出。

GI标准曲线的相关系数为 $R^2=0.998$ ，可从标准品的标准曲线计算出检测样品的拷贝数。

Sample 1的平均Ct值 (CP) 为25.04 (n=2) 时，换算后定量平均值 (CP) 为 1.16×10^5 copies。

【使用Applied Biosystem 7500 Fast Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)】

使用StepOnePlus Real-Time PCR System时，与7500 Fast Real-Time PCR System使用相同的设定进行反应。

绝对定量 实验例

使用下面的样品分别进行GI反应和GII反应。

标准曲线用标准品：1 copy~ 1×10^7 copies (n=3)

检测样品和阴性对照 (n=2)

(1) “Experiment Properties” 设定

Instrument *1: 7500 Fast (96 Wells)

Type of Experiment: Quantification-Standard Curve

Reagent: TaqMan Reagents

Ramp Speed *2: 选择Fast (运行时间约40 minutes)

* 1: 使用StepOnePlus时，选择StepOnePlus Instrument (96 Wells)。

* 2: Ramp Speed 也可在Standard (运行时间约2 hours) 进行测定。

Experiment Properties

Enter an experiment name, select the instrument type, select the type of experiment to set up, then select materials and methods for the PCR reactions and instrument run.

How do you want to identify this experiment?

Experiment Name: Untitled

Barcode (Optional):

User Name (Optional):

Comments (Optional):

Which instrument are you using to run the experiment?

7500 (96 Wells) 7500 Fast (96 Wells)

Set up, run, and analyze an experiment using a fast cycling 5-color, 96-well system.

What type of experiment do you want to set up?

Quantification - Standard Curve Quantification - Relative Standard Curve

Melt Curve Genotyping

Use standards to determine the absolute quantity of target nucleic acid sequence in samples.

Which reagents do you want to use to detect the target sequence?

TaqMan® Reagents SYBR® Green Reagents

The PCR reactions contain primers designed to amplify the target sequence and a TaqMan® probe designed to detect amplification of the target sequence.

Which ramp speed do you want to use in the instrument run?

Standard (~2 hours to complete a run) Fast (~40 minutes to complete a run)

For optimal results with the Fast ramp speed, Applied Biosystems recommends using Fast reagents for your PCR reactions.

(2) Plate Setup设定

1) 选择Define Targets and Samples, 分别设定“Target Name”, “Reporter”和“Quencher”。

1. 点击Add New Target, 可以增加一栏。输入信息:

Target Name: 输入GI和GII。

Reporter: 选择FAM (默认设定)。

Quencher: 在下拉菜单中选择TAMRA。

Color: 在下拉菜单中可变更。

Define Targets and Samples Assign Targets and Samples

Instructions: Define the targets to quantify and the samples to test in the reaction plate.

Define Targets

Add New Target Add Saved Target Save Target Delete Target

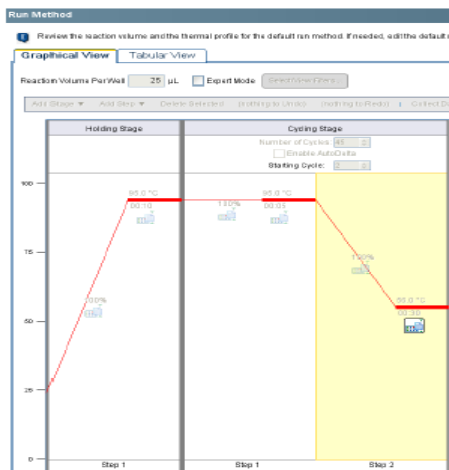
Target Name	Reporter	Quencher	Color
GI	FAM	TAMRA	
GII	FAM	TAMRA	

2. “Define Samples” 的输入
 - 点击Add New Target, 可以追加样品数。
 - 输入样品名称。
 - 根据需要可变更Color。

- 2) 选择Assign Targets and Sample, 进行Plate Layout设定和passive reference设定。
 1. 在“View Plate Layout”处选择反应孔, 在Target的Assign进行 设定。
 2. 在“Task”选择Sample、Standard、Negative Control。
 - U [Unkown]: 检测样品
 - S [Standard]: 标准曲线
 - N [Negative Control]: 阴性对照
 3. 检测样品的反应孔, 在Assign sample (s) 选择样品名。
 4. 标准曲线的反应孔, 在“Quantity”直接输入浓度或使用Define and Set Up Standards 输入浓度。
 5. passive reference选择ROX。(默认设定)



(3) Run Method 设定



预变性 (Hold)

Cycle: 1
95°C 10 sec

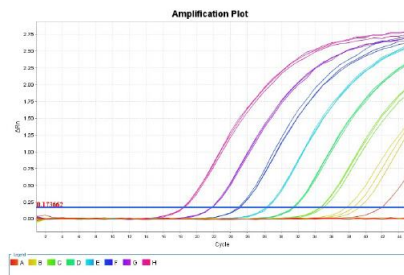
2 Step PCR

Cycle: 45
95°C 5 sec
56°C 30 sec (检测)

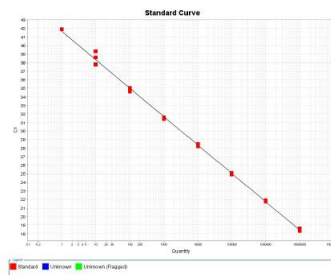
反应体积: 25 μ l

- (4) 点击“Start”键, 开始反应。
- (5) 反应结束后, 确认GI和GII的扩增曲线并制作标准曲线。
标准曲线用标准品: 1 copy~ 1×10^7 copies (n=3)
GI反应

Amplification Plot

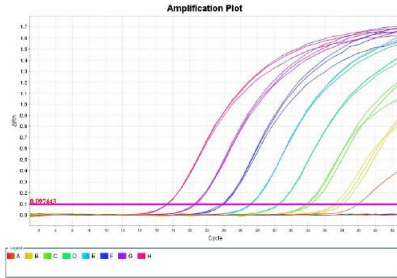


Standard Curve

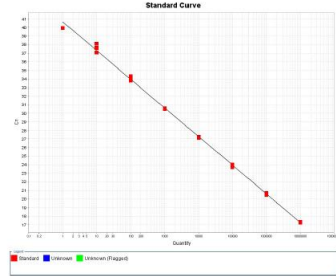


GI反应

Amplification Plot



Standard Curve



注意：1 copy的扩增曲线有时会不超过阈值。

在“View Well Table”可确认Ct值和检测样品的拷贝数。

例) GI反应的标准曲线用标准品和检测样品

#	Well	Omit	Flag	Sample Na...	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...	HIC
67	H11	<input type="checkbox"/>												
68	H12	<input type="checkbox"/>												
69	A3	<input type="checkbox"/>			GI	NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...						
70	B3	<input type="checkbox"/>			GI	NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...						
71	A4	<input type="checkbox"/>	⚠		GI	STANDARD	FAM-TAMRA	41.636	41.221	0.588	1			
72	A5	<input type="checkbox"/>	⚠		GI	STANDARD	FAM-TAMRA	Undetermi...	41.221	0.588	1			
73	A6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	40.805	41.221	0.588	1			
74	B4	<input type="checkbox"/>	⚠		GI	STANDARD	FAM-TAMRA	39.205	39.115	0.129	10			
75	B5	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	39.173	39.115	0.129	10			
76	B6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	38.968	39.115	0.129	10			
77	C4	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	35.615	35.58	0.171	100			
78	C5	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	35.732	35.58	0.171	100			
79	C6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	35.394	35.58	0.171	100			
80	D4	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	32.078	32.113	0.095	1,000			
81	D5	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	32.041	32.113	0.095	1,000			
82	D6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	32.220	32.113	0.095	1,000			
83	E4	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	28.629	28.706	0.067	10,000			
84	E5	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	28.739	28.706	0.067	10,000			
85	E6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	28.750	28.706	0.067	10,000			
86	F4	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	25.446	25.496	0.061	100,000			
87	F5	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	25.563	25.496	0.061	100,000			
88	F6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	25.478	25.496	0.061	100,000			
89	G4	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	22.173	22.218	0.046	1,000,000			
90	G5	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	22.265	22.218	0.046	1,000,000			
91	G6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	22.217	22.218	0.046	1,000,000			
92	H4	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	18.838	18.92	0.072	10,000,000			
93	H5	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	18.951	18.92	0.072	10,000,000			
94	H6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	18.971	18.92	0.072	10,000,000			
95	F7	<input type="checkbox"/>		Sample 1	GI	UNKNOWN	FAM-TAMRA	24.932	24.934	0.003	151,414.531	151,211.266	287.461	
96	F8	<input type="checkbox"/>		Sample 1	GI	UNKNOWN	FAM-TAMRA	24.936	24.934	0.003	151,008	151,211.266	287.461	

在GI反应中，1 copy的标准曲线用标准品n=3检测时，有2个样品检出。

可从标准品的标准曲线计算出检测样品的拷贝数。

Sample 1的平均Ct值 (CP) 为24.93 (n=2) 时，换算后定量平均值 (CP) 为 1.51×10^5 copies。

● 结果判定时的注意事项

- 阴性对照在 FAM 通道有扩增曲线时
 - 怀疑有污染产生，将反应液配制场所及使用仪器进行除污染处理后，将所有样品再次进行反应。
- 标准品 (1 copy 除外) 无扩增曲线
 - 由于某种原因导致 PCR 反应或 Cycling Probe 的检出异常，请再次进行反应。
- 检测样品无扩增曲线
 - NoV在检出界限以下，或检测样品中可能含有反应阻害物，应将检测样品稀释后进行再次反应；有时需要重新制备检测样品。

● 参考文献

- 1) Kapikian A Z, *et al* . *Virology* . (1972)**10**:1075–1081.
- 2) Siebenga J J, *et al* . *Emerg Infect Dis* . (2007)**13**:144–146.
- 3) Oogane T, *et al* . *Jpn J Infect Dis* . (2008)**61**:423–424.
- 4) Kojima S, *et al* . *J Virol. Methods* . (2002)**100**:107–114.
- 5) Director of Inspection and Safety Division, Department of Food Safety, Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare: Norovirus Detection Method. November 5, 2003, Notification No. 1105001 of ISD–DFS; latest version, Notification 1022 No. 1 of ISD–DFS, October 22, 2013
- 6) Director of Department of Food Safety, Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare: Management Manual of Mass Cooking Facilities. Appendix to March 24, 1997–dated JFH Notification No. 85, June 18, 2008–dated DFS No. 0618005 (2008)
- 7) Fujii K, *et al* . *Jpn J Food Microbiol* . (2011)**28**:139–142.

● 关联产品

Thermal Cycler Dice™ Real Time System III with PC (Code No. TP970)
0.1 ml 8–strip tube, individual Flat Caps (Code No. NJ902)
0.2 ml 8–strip tube, individual Flat Caps (Code No. NJ600)
EASY Dilution (for Real Time PCR) (Code No. 9160)
RNase–OFF® (Code No. 9037)

TaKaRa Ex Taq is a registered trademark of Takara Bio Inc.

RNase–OFF is a registered trademark of PureBiotech, LLC.

Thermal Cycler Dice, *Premix Ex Taq*, and PrimeScript are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>