



复能基因  
FulenGen

易锦生物  
iGeneBio

## 用于 RT-PCR 方法定量检测新冠病毒试剂盒的 标准品使用手册

广州复能基因有限公司

广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城  
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼  
邮编: 510663  
电话: 4006-020-200  
邮箱: [sales@igenebio.com](mailto:sales@igenebio.com)  
网址: [www.genecopoeia.com](http://www.genecopoeia.com)  
[www.igenebio.com](http://www.igenebio.com)

## I. 产品介绍

标准品是可掺入“新冠病毒”待测样本或样本采集装置（管）的阳性标准品，用于定量检测来自 DNA 或 RNA 生物体的样本靶标。可提供包括中国 CDC 推荐的 **orf1ab** 和 **N** 的靶标，美国 CDC 推荐的 3 个 **N** 的靶标以及欧洲国家研究所推荐的 **RdRP** 和 **E** 的靶标等在内的 7 个靶标相关阳性标准品。客户可根据自己的需要选择不同靶标的标准品（图 1 所示）。

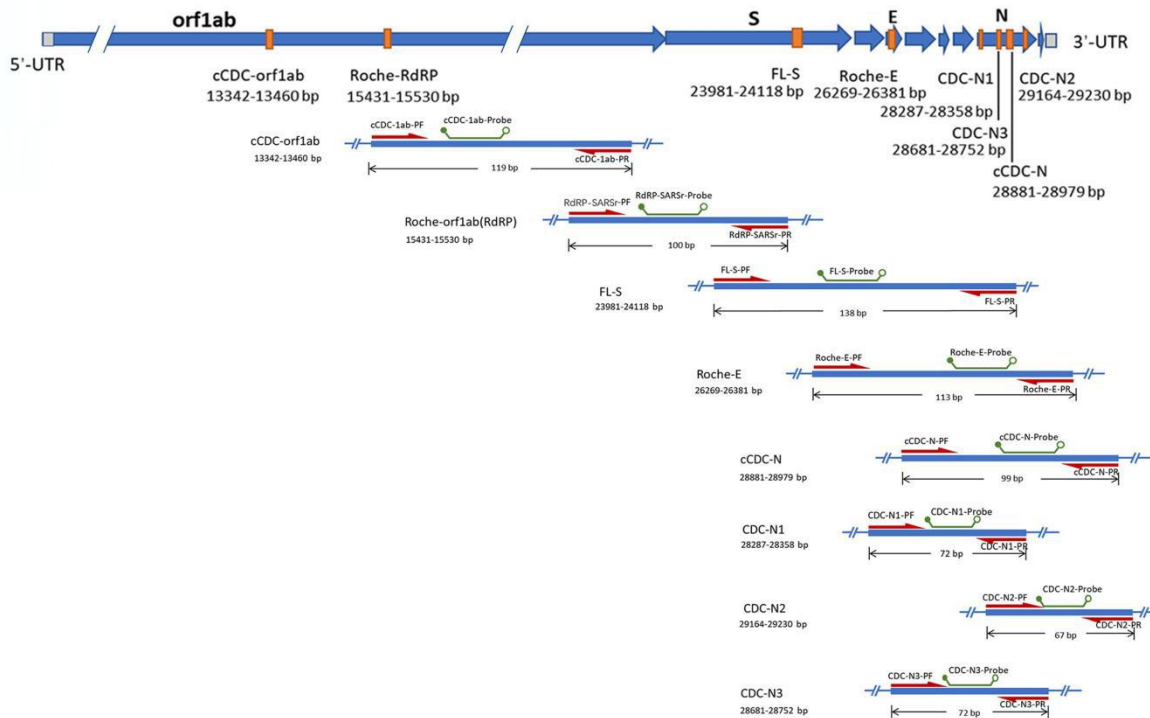


图 1.标准品靶标选择指南

阳性标准品 RNA 用来定量检测新冠病毒 RNA 分子数（图 2 所示）。即在扩增待测样本的同时扩增一系列已知拷贝数的与样本序列相同的标曲，由于标准品模板量的对数值与定量 PCR 时得到的 Ct 值呈线性关系，将扩增标准时所得到的 Ct 值与标准品模板量的对数值做图可得到一条直线。根据得到的待测样本的 Ct 值，通过标准曲线可求得该样本拷贝数的对数值，经过相应的数学转换，可得到待测样本的拷贝数。

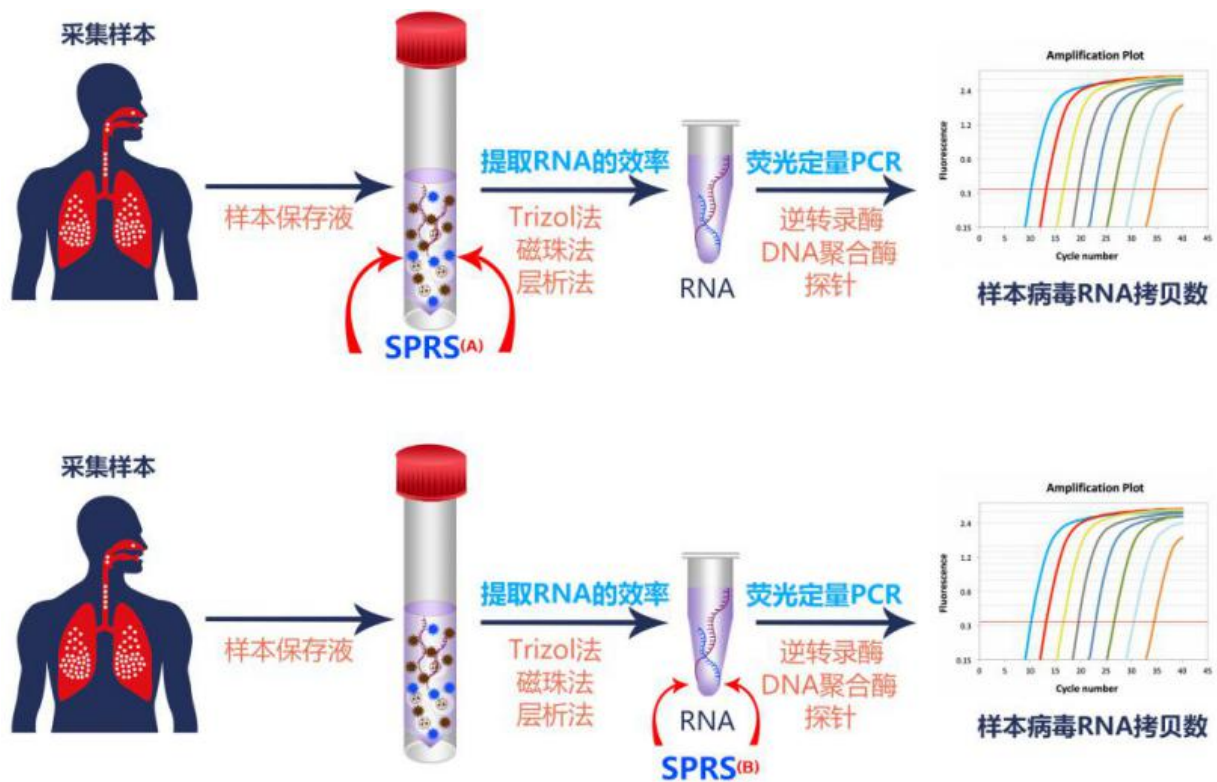


图 2.阳性标准品 RNA 用来定量检测新冠病毒 RNA 分子数的原理

注：SPRS(A)：掺入待测样本或样本采集管的阳性标准品病毒。SPRS(B)：掺入待测样本或样本采集管的阳性标准品病毒 RNA。

## II. 产品组分

| 组分货号     | 标准品         | 描述       | 规格                                 | 存储         |
|----------|-------------|----------|------------------------------------|------------|
| PC017-01 | cCDC-orf1ab | 模拟病毒 RNA | 1×10 <sup>5</sup> copies/μl, 50 μl | -80℃, 分装保存 |
| PC017-02 | cCDC-N      | 模拟病毒 RNA | 1×10 <sup>5</sup> copies/μl, 50 μl | -80℃, 分装保存 |
| PC017-03 | FL-S        | 模拟病毒 RNA | 1×10 <sup>5</sup> copies/μl, 50 μl | -80℃, 分装保存 |
| PC017-04 | Roche-E     | 模拟病毒 RNA | 1×10 <sup>5</sup> copies/μl, 50 μl | -80℃, 分装保存 |
| PC017-05 | CDC-N1      | 模拟病毒 RNA | 1×10 <sup>5</sup> copies/μl, 50 μl | -80℃, 分装保存 |
| PC017-06 | CDC-N2      | 模拟病毒 RNA | 1×10 <sup>5</sup> copies/μl, 50 μl | -80℃, 分装保存 |
| PC017-07 | CDC-N3      | 模拟病毒 RNA | 1×10 <sup>5</sup> copies/μl, 50 μl | -80℃, 分装保存 |
| PC017-08 | Roche-RdRP  | 模拟病毒 RNA | 1×10 <sup>5</sup> copies/μl, 50 μl | -80℃, 分装保存 |

注：样品均是 RNA，避免反复冻融，如需多次使用，请收到样品后分装保存。

### III. 使用说明

以 BlazeTaq™ Probe One-Step RT-qPCR kit (Genecopoeia, Cat.QP076) 试剂盒为例, 说明标准品的使用方法。也可用于其他新冠病毒检测试剂盒。

#### 1、反应体系

| 试剂   | 体积          | 终浓度           |
|--|-------------|---------------|
| Probe One Step RT-qPCR Mix (5×)            | 4 μL        | 1×            |
| BlazeTaq™ RTase Mix (50×)                  | 0.4 μL      | 1×            |
| PCR forward primer (10 μM)                 | 0.4 μL      | 0.2 μM        |
| PCR reverse primer (10 μM)                 | 0.4 μL      | 0.2 μM        |
| Probe (10 μM)                              | 0.2 μL      | 0.1 μM        |
| 样本 RNA                                     | 5 μL        | -             |
| 标准品*                                       | 1 μL        | -             |
| ROX Reference Dye (30 μM), <i>optional</i> | 0.4 -0.1 μL | 600 nM~150 nM |
| ddH <sub>2</sub> O                         | to 20 μL    |               |

\*将标准品稀释成不同拷贝数梯度, 绘制标准曲线, 来定量样本 RNA 拷贝数。

#### 2、设置 RT-qPCR 程序

根据下表设置 RT-qPCR 程序进行反应

| 循环数 | 步骤  | 温度   | 时间     | 检测与否 |
|-----|-----|------|--------|------|
| 1   | 逆转录 | 50°C | 10 min | 否    |
| 1   | 预变性 | 95°C | 30 sec | 否    |
| 40  | 变性  | 95°C | 10 sec | 否    |
|     | 延伸  | 60°C | 30 sec | 是    |

#### 3、结果分析

根据不同拷贝数梯度的标准品绘制的标准曲线, 计算样本拷贝数。

### IV. 案例解析

以已知拷贝数的质控品为待测样本来分析标准品的作用。不同拷贝数质控品参与反应时, 测试标准品 RNA-N 的拷贝数梯度。

1、 反应结果 Ct 值如下：

| 标准品RNA-N<br>copies/rxn | 质控品RNA<br>copies/rxn |                | 1000  | 500   | 300   | 200   | 100   | 50    | 0     |
|------------------------|----------------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 300 copies             | 质控品RNA               | S-FAM          | 23.23 | 24.78 | 26.11 | 27.2  | 27.46 | 29.45 | NA    |
|                        |                      | N-HEX          | 24.78 | 26.32 | 26.65 | 28.11 | 28.47 | 29.5  | NA    |
|                        | 人293T<br>RNA         | GAPDH2-<br>CY5 | 23.61 | 23.8  | 23.51 | 23.87 | 23.29 | 23.17 | 23.93 |
|                        | 标准品RNA               | N-AP593        | 26.91 | 27.04 | 26.97 | 26.99 | 26.93 | 26.99 | 27.09 |
| 200 copies             | 质控品RNA               | S-FAM          | 23.98 | 25.32 | 25.81 | 27.53 | 26.95 | 28.54 | NA    |
|                        |                      | N-HEX          | 25.49 | 26.81 | 27.33 | 28.19 | 28.52 | 31.54 | NA    |
|                        | 人293T<br>RNA         | GAPDH2-<br>CY5 | 23.56 | 23.96 | 23.67 | 24.59 | 23.89 | 24.85 | 24.73 |
|                        | 标准品RNA               | N-AP593        | 27.58 | 27.57 | 27.35 | 27.5  | 27.54 | 27.58 | 27.43 |
| 100 copies             | 质控品RNA               | S-FAM          | 24.11 | 25.18 | 26.1  | 27.46 | 27.6  | 28.62 | NA    |
|                        |                      | N-HEX          | 25.8  | 26.6  | 26.9  | 29.3  | 28.67 | 30.03 | NA    |
|                        | 人293T<br>RNA         | GAPDH2-<br>CY5 | 23.91 | 23.86 | 24.1  | 24.86 | 24.14 | 23.96 | 23.84 |
|                        | 标准品RNA               | N-AP593        | 29.05 | 28.62 | 28.3  | 28.87 | 28.59 | 28.59 | 28.46 |
| 50 copies              | 质控品RNA               | S-FAM          | 24.39 | 25.38 | 26.47 | 26.62 | 27.1  | 28.46 | NA    |
|                        |                      | N-HEX          | 25.75 | 27.09 | 27.21 | 28.39 | 28.88 | 29.69 | NA    |
|                        | 人293T<br>RNA         | GAPDH2-<br>CY5 | 24.1  | 23.8  | 23.86 | 24.23 | 24.09 | 23.89 | 24.24 |
|                        | 标准品RNA               | N-AP593        | 30.74 | 29.69 | 29.61 | 29.71 | 29.71 | 29.34 | 29.54 |

2、 200 拷贝数和 100 拷贝数质控品参与反应时， 绘制标准品的标准曲线如下：

| 标准品<br>RNA-N Ct 值 | 质控品<br>copies/rxn | 标准品RNA-N<br>copies/rxn |       |       |       |       |       | 不同质控品拷<br>贝数时标准品<br>的平均Ct 值 |
|-------------------|-------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------------|
|                   |                   | 1000                   | 500   | 300   | 200   | 100   | 50    |                             |
| 300               |                   | 26.91                  | 27.04 | 26.97 | 26.99 | 26.93 | 26.99 | 26.97                       |
| 200               |                   | 27.58                  | 27.57 | 27.35 | 27.5  | 27.54 | 27.58 | 27.52                       |
| 100               |                   | 29.05                  | 28.62 | 28.3  | 28.87 | 28.59 | 28.59 | 28.67                       |
| 50                |                   | 30.74                  | 29.69 | 29.61 | 29.71 | 29.71 | 29.34 | 29.80                       |

