

甲型流感病毒 H1N1 亚型双重探针法 qRT-PCR 试剂盒

Influenza Virus A H1N1 Duplex Probe qRT-PCR Kit

目录号: **ml107888**

使 用 说 明 书

产品及特点

流感病毒分为甲、乙、丙三型，其中甲型流感病毒容易发生变异，流感大流行就是甲型流感病毒出现新亚型或旧亚型重现引起的。甲型流感病毒是 A 型流感病毒，根据 H 和 N 抗原不同，又分为许多亚型，H 可分为 18 个亚型(H1~H18)，N 可分为 11 个亚型(N1~N11)。其中导致人类感染甲型流感病毒主要是 H1N1。人感染甲型流感病毒后的早期症状与普通流感相似，包括发热、咳嗽、喉咙痛、身体疼痛、头痛、发冷和疲劳等，有些还会出现腹泻或呕吐、肌肉痛或疲倦、眼睛发红等。由于人群对甲型流感病毒普遍易感，并可以人传染人，因此快速检测甲型流感病毒 H1N1 亚型对甲型流感病毒的及早发现，避免其大范围传播具有重要意义。本产品就是以探针法 qRT-PCR 技术为基础开发的对甲型流感病毒 H1 亚型和 N1 亚型的分型检测的试剂盒，**它具有下列特点：**

1. 即开即用，用户只需要提供样品 RNA 模板。
2. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/反应。

3. 提供阳性对照，便于排除假阴性结果。
4. 特异性高，引物和探针分别根据甲型流感病毒 H1 亚型和 N1 亚型 RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
5. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。
6. 两个探针分别用 FAM 和 HEX 标记，检测和分型同时完成。
7. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法 RT-PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	规格	包装
探针法 qRT-PCR 缓冲液	500 μ L	0.5 mL 本色管
探针法 qRT-PCR 酶混合液	100 μ L	0.5 mL 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1 mL	1.5 mL 绿盖管
甲型流感病毒 H1N1 亚型 RT-PCR 引物-探针干粉	50 次	0.5 mL 棕色管
甲型流感病毒 H1 亚型 阳性对照(1×10^7 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5 mL 黄盖管
甲型流感病毒 N1 亚型 阳性对照(1×10^7 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5 mL 白盖管
使用手册	1 份	无
本产品使用十孔盒包装		
注意: 引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 220 μ L 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。本试剂盒采用 DNA 作为阳性对照，不能有效监控核酸纯化和 RT 过程。如果需要 RNA 模板，需要另外定做。		

使用方法

一、稀释甲型流感病毒 H1 亚型检测标准曲线样品（以阳性对照 10E1-10E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度）。由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分。

1. 标记 6 个离心管，分别为 A6，A5，A4，A3，A2，A1。
2. 在 A1-A6 号管中各加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液。
3. 在 A6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照（试剂盒提供），充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 拷贝/μL 的标准曲线 PC 样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 A5 号管中加入 5μL 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 A4 号管中加入 5 μL 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 1×10E4 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作得到 A1-A6 共六个稀释度的标准曲线阳性样品。放冰上待用。

二、稀释甲型流感病毒 N1 亚型检测标准曲线样品

7. 操作同上，只是使用甲型流感病毒 N1 亚型的 PC 作为模板。得到 6 个浓度的样本放冰上待用，分别是 B1-B6。

三、样品 RNA 的制备

8. 如果有 N 个样品，设置 N+3 个提取，多出的一个是甲型流感病毒 H1 亚型的 PC（样品制备阳性对照），一个是甲型流感病毒 N1 亚型的 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10 μL 第一步和第二步所得的 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟样本制备试剂盒所要求的起始样本体积一样，以此分别作为两个 PC。另外用水作为 NC，水的总体积需要跟样本制备试剂盒所要求的样本体积一样。**注意：本试剂盒采用 DNA 作为阳性对照，不能有效监控核酸纯化和 RT 过程。如果需要 RNA 模板，需要另外定做。**

9. 用自选方法纯化样品的 RNA。本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容，也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

四、Probe qRT-PCR 反应 (20 μ L 体系，在样品制备室进行)

10. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+3+1+6+6 个 RT-PCR 管，其中 N+3 个用于上步得到的 N+3 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照（用水做模板），6 个用于甲型流感病毒 H1 亚型的标准曲线，另外 6 个用于甲型流感病毒 N1 亚型的标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复，则标记 N+3+3 个 RT-PCR 管，其中 N+3 个用于上步得到的 N+3 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于甲型流感病毒 H1 亚型 RT-PCR 阳性对照，1 个用于甲型流感病毒 N1 亚型 RT-PCR 阳性对照（直接用第一步和第二步所得的两个 4 号稀释液作为模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

11. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复）：

成分	样品管 N+3 个	RT-PCR 阴性 对照	标曲样品管 (A1-A6)	标曲样品管 (B1-B6)
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 μ L	10 μ L	各 10 μ L	各 10 μ L
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 μ L	2 μ L	各 2 μ L	各 2 μ L
甲型流感病毒 H1N1 亚型 RT-PCR 引物 -探针混合液	各 4 μ L	4 μ L	各 4 μ L	各 4 μ L
N+3 个待测 RNA	各 4 μ L	不加	不加	不加
超纯水	不加	4 μ L	不加	不加
第一步所得标准曲线 样品稀释液 (A1-A6 号)	不加	不加	各 4 μ L	不加
第二步所得标准曲线 样品稀释液 (B1-B6 号)	不加	不加	不加	各 4 μ L

12. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 RT-PCR：

过程	温度	时间
逆转录	50°C	15 min
预变性	95°C	10 min
RT-PCR 反应 (45 个循环)	94°C	30 sec
	60°C	60 sec (采集 FAM 通道和 HEX 通道两个通道的荧光信号, 淬灭基团均为 TAMRA)

五、数据处理

13. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性, 则整个扩增或制备实验无效, 不需要分析数据, 需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性, 说明环境污染, 则整个扩增或制备实验无效, 不需要分析数据, 需要跟厂家联系, 购买新的引物和探针。

14. 如果阴性对照和阳性对照正常, 则实验有效, 可以进入后续分析。

15. 对定量检测, 以标曲样本浓度的 log 值为横轴, 分别以甲型流感病毒 H1 亚型阳性对照 (FAM 通道) 和甲型流感病毒 N1 亚型阳性对照 (HEX 通道) 的 Ct 值为纵轴, 绘制两条标准曲线, r2 必须大于 0.95。再以待测样品的 Ct 值从分别从两条标准曲线上推算出对应样品 RNA 浓度的 log 值, 再推算出其浓度。

16. 对定性检测, 只判断阳性或阴性, 则阴性对照 FAM 通道的 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照 FAM 通道的荧光信号必须有对数增长, 有典型扩增曲线, Ct 值应该小于或等于 35。对待测样品, 如果其 FAM 通道的 Ct 大于或等于 40 则为甲型流感病毒 H1 亚型阴性, 如果小于或等于 35 则为甲型流感病毒 H1 亚型阳性。如果其 HEX 通道的 Ct 大于或等于 40 则为甲型流感病毒 N1 亚型阴性, 如果小于或等于 35 则为甲型流感病毒 N1 亚型阳性。如果在 35-40 之间, 则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性, 如果小于 40, 则为阳性。

自备试剂	样品 RNA，超纯水
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。