甲型流感病毒 H10N7 亚型双重探针法 qRT-PCR 试剂盒

Influenza Virus A H10N7 Duplex Probe qRT-PCR Kit

目录号: [ml107902](#)

使 用 说 明 书

产品及特点

流感病毒分为甲、乙、丙三型，其中甲型流感病毒最容易发生变异，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(H10~H108)，N 可分为 11 个亚型(N7~N71)。其中，H10N7 最早于英国被发现，主要在水禽中流行，包括鸭、鹅和鹤等。近年来，H10N7 也在人类中发现，但仍属于罕见病例。甲型流感病毒 H10N7 的传播途径与其他流感病毒相似，主要通过空气飞沫传播，也可以通过接触污染物体表面等途径传播，症状也与其他流感病毒相似，包括发热、咳嗽、喉咙痛、肌肉疼痛、头痛、乏力等。但由于该亚型在人类中的感染较少，临床表现尚未得到充分研究。因此快速检测甲型流感病毒 H10N7 亚型对水禽水产业具有重要意义。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 H10 亚型和 N7 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 H10 亚型和 N7 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 H10N7 亚型 RT-PCR 引物-探针干粉	50 次	0.5 mL 棕色管
甲型流感病毒 H10 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 N7 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		
<p>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 mL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20°C保存。本试剂盒采用 DNA 作为阳性对照，不能有效监</p>		

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 H10 亚型检测标准曲线样品 (以阳性对照 10E1-10E6 拷贝/mL 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 mL 荧光 PCR 专用模板稀释液。
3. 在 A6 号管中加入 5 mL 1×10^7 拷贝/mL 的阳性对照 (试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^6 拷贝/mL 的标准曲线 PC 样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 A5 号管中加入 5 mL 1×10^6 拷贝/mL 的阳性对照 (上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 拷贝/mL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 A4 号管中加入 5 mL 1×10^5 拷贝/mL 的阳性对照 (上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^4 拷贝/mL 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 N7 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 N7 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，最好设置 N+3 个提取，多出的一个是甲型流感病毒 H10 亚型的 PC (样品制备阳性对照)，一个是甲型流感病毒 N7 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 mL 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。

三、Probe qRT-PCR 反应 (20 mL 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 H10 亚型的标准曲线，另外 6 个用于甲型流感病毒 N7 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 H10 亚型 RT-PCR 阳性对照，1 个用于甲型流感病毒 N7 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 μL	10 μL		各 10 μL
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	各 2 μL	1 μL		各 1 μL
甲型流感病毒 H10 qRT-PCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL		各 3 μL
N+2 个待测 RNA 样本	各 6 μL	不加		不加
超纯水	不加	6 μL		不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加		各 6 μL

10. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 qRT-PCR：

过程	温度	时间
逆转录	50°C	10 min
预变性	95°C	10 min
PCR 反应 (40 个循环)	95°C	15 sec
	60°C	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 NFQ)

四、数据处理

11. 如果样本制备阳性对照或 RT-PCR 阳性对照(包括标曲样本)结果为阴性,则整个实验无效,不需要分析数据,需要重新样本制备,重新进行 RT-PCR 扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或 RT-PCR 阴性对照结果为阳性,说明环境污染,则整个实验无效,不需要分析数据,需要跟厂家联系。

12. 如果阴性对照和阳性对照均正常,则实验有效,可以进入后续分析。

13. 如果把本试剂盒用于定量检测,则以阳性对照浓度的 log 值为横轴,以 Ct 值为纵轴,绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的 log 值,再推算出其浓度。

14. 如果把本试剂盒用于定性检测,只判断阳性或阴性,则阴性对照 Ct 必须没有读数,或者大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长,有典型扩增曲线,Ct 值应该小于 40。对待测样品,如果其 Ct 没有读数、大于或等于 40 则均为阴性,如果小于 40 则为阳性。

自备试剂	样品 RNA, 超纯水, 核酸纯化试剂盒。
运输及保存	低温运输, -20°C 保存, 有效期 1 年。