

甲型流感病毒 H3 亚型探针法 qRT-PCR 试剂盒

Influenza Virus A H3 Probe qRT-PCR Kit

目录号: **ml107936**

使 用 说 明 书

产品及特点

甲型流感病毒(Influenza Virus A), 也称禽流感病毒, 是一种常见负链 RNA 流感病毒, 其病毒颗粒包含了 8 段不同的 RNA 基因。在病毒颗粒的表面, 存在两种为主要的蛋白质, 即血凝素(Hemagglutinin, H)和神经氨酸酶(Neuraminidase, N), 它们决定了病毒的亚型。其中, 甲型流感病毒 H3 亚型主要在人群中广泛传播。甲型流感病毒 H3 亚型的 H 蛋白质允许病毒侵入宿主细胞, 而 N 蛋白质则有助于病毒释放出宿主细胞。这两种蛋白质也是流感病毒的主要抗原, 它们决定了病毒的免疫原性和毒力。甲型流感病毒 H3 亚型感染人类会引发禽流感, 该病症状主要表现为高热、咳嗽、流涕、肌痛等, 多数伴有严重的肺炎, 严重者心、肾等多种脏器衰竭导致死亡, 病死率很高。因此快速灵敏诊断甲型流感病毒 H3 亚型具有重要意义。本产品以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测甲型流感病毒 H3 亚型的试剂盒, **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/μL。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据甲型流感病毒 H3 亚型 RNA 高度保守区设计，不会跟其他的 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. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	规格	包装
探针法 RT-PCR 缓冲液	0.5 mL	0.5 mL 蓝盖管
探针法 RT-PCR 酶混合液 v2	50 μL	0.5 mL 红盖管
荧光 PCR 模板专用稀释液	1 mL	1.5 mL 绿盖管
超纯水	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
甲型流感病毒 H3 亚型 qRT-PCR 引物-探针干粉	50 次	1.5 mL 棕色管
甲型流感病毒 H3 亚型 qRT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用五孔盒包装		
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 165uL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。		

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以 $10E1$ - $10E6$ 拷贝/ μ L 这 6 个 10 倍稀释度为例）。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）。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供无传染性的 DNA 片段作为阳性对照。

1. 标记 6 个离心管，分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。
2. 用带芯枪头分别加入 45 μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头，下同）。
3. 在 6 号管中加入 5 μ L $1 \times 10E7$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E6$ 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μ L $1 \times 10E6$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E5$ 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μ L $1 \times 10E5$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E4$ 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到 6 稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

二、样品 RNA 的制备

7. 如果有 N 个样品，设置 N+2 个提取，多出的一个是样品制备 PC（样品制备阳性对照），一个是样品制备 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10 μ L 阳性对照的 10000 倍稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为样品制备 PC。另外用水作为样品制备 NC。
8. 用自选方法纯化样品的 RNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒 RNA 提取试剂盒兼容。

三、设置 qRT-PCR 反应（20 μ L 体系，在样品制备室进行）

9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），5 个用于标准曲线。如果做定性分析，并且只做 1 次重复，则标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性

对照（用水做模板），1 个用于 PCR 阳性对照（用试剂盒提供的阳性对照的 10000 倍稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

10. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后加）：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对 照管	标准曲线 样品管 (1-6 管)
探针法 qRT-PCR 缓冲液	10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
探针法 qRT-PCR 酶混合液	2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
甲型流感病毒 H3 亚型探针法 qRT-PCR 引物- 探针混合液	3 μ L	3 μ L	各 3 μ L
N+2 个待测 RNA 样本	5 μ L	不加	不加
超纯水	不加	5 μ L	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (2-6 号)	不加	不加	各 5 μ L

11. 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	5 min
PCR 反应 (40 个循环)	95°C	15 sec
	60°C	60sec (采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 BHQ1)

四、数据处理

12. 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。 13. 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。 14. 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。 15. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 大于或等于 35。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 35，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 35，则为阴性。如果 Ct 小于 35 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。