

天
净
沙
系
列

CAT#:15-15900
低温运输, -20℃保存

BINGENE

甲型流感 (禽流感)病毒探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

Influenza Virus A Probe qRT-PCR Kit

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

<p>产品及特点</p>	<p>甲型流感（禽流感）病毒(Influenza VirusA)会引发禽流感，一般认为任何年龄均具有易感性，但 12 岁以下儿童发病率较高，病情较重。常见的症状有单纯型流感，该症状仅有上呼吸道卡他性炎症变化，黏膜可见充血、水肿及淋巴细胞浸润，除此之外还有肺炎型流感，甚至引起严重并发症，导致急性呼吸窘迫综合征等因此快速灵敏诊断具有重要意义。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（禽流感）病毒的通用试剂盒，它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 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 各数量级。 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。 																							
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>五孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>探针法 qRT-PCR 缓冲液</td> <td>190504a</td> <td>500μL (蓝盖)</td> </tr> <tr> <td>探针法 qRT-PCR 酶混合液</td> <td>190504b</td> <td>100μL (红盖)</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>180701</td> <td>1mL (绿盖)</td> </tr> <tr> <td>甲型流感病毒通用探针法 RT-PCR 引物-探针混合液</td> <td>yp15-15900</td> <td>150μL (棕色管)</td> </tr> <tr> <td>甲型流感病毒通用探针法 RT-PCR 阳性对照(1×10^7 拷贝/μL)</td> <td>pc15900-HM590431.1</td> <td>50μL (黄盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>15-15900sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	五孔盒包装	探针法 qRT-PCR 缓冲液	190504a	500 μL (蓝盖)	探针法 qRT-PCR 酶混合液	190504b	100 μL (红盖)	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL (绿盖)	甲型流感病毒通用探针法 RT-PCR 引物-探针混合液	yp15-15900	150 μL (棕色管)	甲型流感病毒通用探针法 RT-PCR 阳性对照(1×10^7 拷贝/ μL)	pc15900-HM590431.1	50 μL (黄盖)	使用手册	15-15900sc	1 份
成分	编号	五孔盒包装																						
探针法 qRT-PCR 缓冲液	190504a	500 μL (蓝盖)																						
探针法 qRT-PCR 酶混合液	190504b	100 μL (红盖)																						
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL (绿盖)																						
甲型流感病毒通用探针法 RT-PCR 引物-探针混合液	yp15-15900	150 μL (棕色管)																						
甲型流感病毒通用探针法 RT-PCR 阳性对照(1×10^7 拷贝/ μL)	pc15900-HM590431.1	50 μL (黄盖)																						
使用手册	15-15900sc	1 份																						
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20$^{\circ}\text{C}$ 保存，保存期限为 12 个月。</p>																							
<p>自备试剂</p>	<p>样品 RNA，超纯水。</p>																							
<p>使用方法</p>	<p>一、稀释标准曲线样品（以 10E1-10E6 拷贝/μL 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。</p> <ol style="list-style-type: none"> 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, 最好用带芯枪头, 下同)。
3. 在 6 号管中加入 5 μ L 1×10^7 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^6 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 1×10^6 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^5 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 1×10^5 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^4 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, 最好设置 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最后加) :

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
甲型流感病毒通用探针法 RT-PCR 引物-探针混合液	3 μ L	3 μ L	各 3 μ L
N+2 个待测 RNA 模板	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 (1 号样到 1 号管, 2 号样到 2 号)

管…)

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℃	30min
预变性	95℃	10min
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15sec
	55℃	30sec (采集 FAM 通道的荧光信号)
	72℃	30sec

四、数据处理

12. 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 cDNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。
13. 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 值应该小于或等于 35。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性，如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。若重复结果 Ct 值小于 35，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

关联产品

甲型流感(禽流感)病毒通用探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒