天净沙系列

CAT#:13-15930

低温运输，-20℃保存

天净沙

甲型流感病毒 H3 亚型电泳法 RT-PCR 试剂盒

Influenza Virus A H3 RT-PCR Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

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，其基因组长度约为 13.6 knt。在病毒颗粒的表面，存在两种最为主要的蛋白质，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，因此快速检测甲型流感病毒 H3 亚型具有重要的意义。本产品就是以 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. 产品经过精心优化，分析灵敏度可达达 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性结果。
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，分析发现它能检测甲型流感病毒 H3 亚型，不会跟除此之外的其他生物的 RNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的常规 PCR 反应。
6. 本产品只能用于定性实验，不能用于定量实验。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装
2×RT-PCR Buffer	91202a	0.5 mL	0.5 mL 本色管
10×RT-PCR 酶混合液	91202b	50 μL	0.5 mL 红盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
甲型流感病毒 H3 亚型 RT-PCR 引物干粉	yw13-15930	50 次	0.5 mL 白盖管
甲型流感病毒 H3 亚型 RT-PCR 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc15930	250 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	13-15930sc	1 份	无

注：引物干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 110 μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。为避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供专一的 DNA 片段作为阳性对照。如果需要 RNA 片段作为阳性对照的需要单独定制。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备试剂

样品 RNA

使用方法

一、样品 RNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，必须设置 N+2 个提取反应，多出的两个中一个是 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用试剂盒提供的 PCR 阳性对照（1E4 拷贝/μL，本试剂盒提供）10 μL 加上一定量的水作为制备的阳性对照（加水后其总体积跟核酸制备试剂盒所要求的起始样品体积一样）。可以直接用水作为制备的阴性对照。
2. 用自选方法纯化上述 N+2 个样品的 RNA。本试剂盒跟市场上大多数样品 RNA 提取试剂盒兼容。也可以选用本公司的相关的核酸提取试剂盒。

二、设置 RT-PCR 反应（20 μL 体系）

3. 标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 RNA 样品，额外增加的两个管一个用于 PCR 阳性对照，另一个用于 RT-PCR 阴性对照。按照下表在各 PCR 管中加入下列成分:

成份	N+2 个 样品管	RT-PCR 阴性对照	RT-PCR 阳性对照
2×RT-PCR Buffer	各 10 μL	10 μL	10 μL
10×RT-PCR 酶混合液	1 μL	1 μL	1 μL
甲型流感病毒 H3 亚型 RT-PCR 引物混合液	各 2 μL	2 μL	2 μL
制备的 N+2 个 RNA 样品	各 7 μL	不加	不加
超纯水	不加	7 μL	不加
甲型流感病毒 H3 亚型 RT-PCR 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	7 μL

4. 上机进行 RT-PCR，RT-PCR 反应参数为:

过程	**温度**	**时间**
逆转录	42℃	55 min
预变性	95℃	5 min
PCR 反应 （30 个循环）	95℃	15 sec
	55℃	60 sec
	65℃	60 sec
延伸	72℃	10 min

	三、电泳分析 5. 取 10 μL 扩增产物进行常规琼脂糖电泳，检测扩增效果，由于扩增产物较短，建议用 1.5%-2.0%的琼脂糖凝胶。 6. 阳性样品预期得到的扩增产物长度为 110 bp。如果两个阴性对照（样品制备阴性对照或 RT-PCR 阴性对照）有此扩增产物，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析实验结果。如果所有样品和 RT-PCR 阳性对照均无此扩增产物，则说明有系统性的问题（试剂，设备，程序，操作等），需要重复并排查原因。 7. 如果没有上述两种情况，则实验有效，可以分析样品的扩增结果。N+2 个样品中扩增产物的判断为阳性，无则判定为阴性。
关联产品	甲型流感病毒 H3 亚型荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒