天净沙系列

CAT#:15-15919-15930

低温运输，-20℃保存

天净沙

甲型流感病毒 H1/H3 亚型双重探针法 qRT-PCR 试剂盒

Influenza Virus A H1/H3 Duplex Probe qRT-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

本产品是甲型流感病毒 H1/H3 亚型双重探针法 qRT-PCR 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 H3 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 μL 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

本产品使用十一孔盒包装

成分	编号	规格	包装
探针法 qRT-PCR 缓冲液	990504a	500 μL	0.5 mL 本色管
探针法 qRT-PCR 酶混合液	990504b	100 μL	0.5 mL 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
甲型流感病毒 H1/H3 亚型 RT-PCR 引物-探针干粉	yp15-15919-15930	50 次	0.5 mL 棕色管
甲型流感病毒 H1 亚型 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	pc15-15919	50 μL	0.5 mL 黄盖管
甲型流感病毒 H3 亚型 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	pc15-15930	50 μL	0.5 mL 白盖管
使用手册	15-15919-15930sc	1 份	无

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 μL 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。

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，超纯水

使用方法

一、稀释甲型流感病毒 H1/H3 亚型检测标准曲线样品（以阳性对照 1E1-1E6 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 1E7 拷贝/μL 的 H1 亚型阳性对照（试剂盒提供），充分震荡 1 分钟，得 1E6 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 5 μL 1E6 拷贝/μL 的阳性对照（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 1E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。

5. 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。

6. 操作同上，只是使用甲型流感病毒 H3 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

7. 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 H1 亚型的 PC，一个是甲型流感病毒 H3 亚型的 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC。可以用 10 μL 第 5 步和第 6 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。**注意：如果需要 RNA 模板，需要另外定做。**

8. 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 μL 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+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 H3 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 H3 亚型 RT-PCR 阳性对照（直接用第 5 步和第 6 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。

10. 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	各 10 μL
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 μL	2 μL	各 2 μL	各 2 μL
甲型流感病毒 H1/H3 亚型 RT-PCR 引物-探针混合液	各 4 μL	4 μL	各 4 μL	各 4 μL
N+3 个待测 RNA	各 4 μL	不加	不加	不加

超纯水	不加	4 μL	不加	不加
第 5 步所得标准曲线样品稀释液（A1-A6 号）	不加	不加	各 4 μL（A2 号样到 A2 号管，A3 号样到 A3 号管…）	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液（B1-B6 号）	不加	不加	不加	各 4 μL（B2 号样到 B2 号管，B3 号样到 B3 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℃	15 min
预变性	95℃	10 min
RT-PCR 反应（45 个循环）	94℃	30 sec
	60℃	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）

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，，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，需要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. 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 H3 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。
15. 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 H3 亚型阴性，如果小于或等于 35 则为甲型流感病毒 H3 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。

关联产品	甲型流感病毒 H5/H7/H9 亚型三重探针法 qRT-PCR 试剂盒（不含内参）