天净沙系列

CAT#:15-15950-3

低温运输，-20℃保存

天净沙

甲型流感病毒 H5/H7/H9 亚型三重探针法 qRT-PCR 试剂盒

Influenza A Virus H5/H7/H9 Subtype Triplex 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 H5/H7/H9 亚型三重探针法 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禽流感病毒 H5 型、H7 型以及 H9 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 4 个数量级。
6. 禽流感病毒 H5 型、H7 型及 H9 型分别用 FAM、ROX 和 HEX 标记的三个探针检测。
7. 本产品足够 50 次 20μL 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

本产品使用十孔盒包装

成分	编号	规格	包装
探针法 RT-PCR 缓冲液	990504a	500 μL	0.5mL 蓝盖管
探针法 RT-PCR 酶混合液 v2	990504bv2	100 μL	0.5mL 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5mL 绿盖管
禽流感病毒 H5/H7/H9 亚型三重 RT-PCR 引物-探针干粉	Yp15-15950-3	50 次	0.5mL 棕色管
禽流感病毒 H5 型阳性对照（1E7 拷贝/μL）	Pc15950	50 μL	0.5mL 棕色管
禽流感病毒 H7 型阳性对照（1E7 拷贝/μL）	Pc15970	50 μL	0.5mL 棕色管
禽流感病毒 H9 型阳性对照（1E7 拷贝/μL）	Pc15990	50 μL	0.5mL 黄盖管
使用手册	15-15950-3sc	1 份	无

注意：在使用前需要短暂离心引物-探针干粉管，然后在离心管中加入 220uL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备物品

样品 RNA。

使用方法

一、稀释禽流感病毒 H5/H7/H9 型标准曲线样品（以 1E1-1E6 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。

1. 标记 6 个离心管，分别为 A6，A5，A4，A3，A2，A1。

2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液。

3. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/μL 的禽流感病毒 H5 型阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。

4. 换枪头，在 5 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 共六个稀释度标准曲线阳性样品。放冰上待用。

6. 操作同上，只是使用试剂盒提供禽流感病毒 H7/H9 型阳性对照作为模板。得到 6 个浓度的样本放冰上待用，分别是 B1-B6/C1-C6。

四、样品 RNA 的制备

7. 如果有 N 个样品,最好设置 N+4 个提取,多出的 3 个是禽流感病毒 H5 型/H7 型/H9 型的 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用自备的、确定是阳性的样本作为样品制备阳性对照，可以用自备的、确定是阴性的样本作为样品制备阴性对照，可以用水替代。

8. 用自选方法纯化样品的 RNA（含内参），本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容。

五、Probe RT-PCR 反应（20μL 体系，在样品制备室进行）

9. 如果有 N+2 个核酸提取，则设置 N+3 个 RT-PCR 反应，多出的一个是扩增阴性对照。再根据需要做 1-3 个标曲，每个标曲需要 6 个反应。下表只是以做 1 个 N 基因的标曲为例。如果还要做 S 和 E 基因的标曲，请参考下表再各设置 6 各标曲反应:

成分	样品管 N+2 个	RT-PCR 阴性对照	标曲样品管 (A1-A6)
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	2 μL	各 2 μL
禽流感病毒 H5/H7/H9 亚型三重 RT-PCR 引物-探针混合液	各 4 μL	4 μL	各 4 μL
N+2 个待测 RNA	各 4 μL	不加	不加
超纯水	不加	4 μL	不加
第一步所得标准曲线 样品稀释液 (A1-A6 号)	不加	不加	各 4μL（A1 号样到 A1 号管，A2 号样到 A2 号管…）

10. 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
PCR 反应 （45 个循环）	94℃	30 sec
	60℃	60 sec（采集 FAM 通道、ROX 通道和 HEX 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

六、数据处理

11. 如果所有标曲扩增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。
12. 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。
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，分别以阳性对照（FAM 通道、HEX 通道和 ROX 通道）的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照的标准曲线为斜线，r2 必须大于 0.95。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照的标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。
14. 对定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照 FAM、ROX 及 HEX 通道的 Ct 必须大于或等于 40。禽流感病毒 H5 型阳性对照 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 则为禽流感病毒 H5 型阴性，如果小于或等于 35 则为禽流感病毒 H5 型阳性。禽流感病毒 H7 型阳性对照 ROX 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 ROX 通道的 Ct 大于或等于 40 则为禽流感病毒 H7 型阴性，如果小于或等于 35 则为禽流感病毒 H7 型阳性。禽流感病毒 H9 型阳性对照 HEX 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 HEX 通道的 Ct 大于或等于 40 则为禽流感病毒 H9 型，如果小于或等于 35 则为禽流感病毒 H9 型。

关联产品	新型冠状病毒荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒