天净沙系列

CAT#:15-15919-15901-SN

低温运输，-20℃保存

天净沙

国境口岸甲型 H1N1(2009)流感病毒检测探针法荧光定量 PCR 试剂盒(不含内参，商检标准 SN/T 3311-2012)

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 H1N1(2009)流感病毒[influenza A 2009(H1N1)virus]是一种于2009 年 4 月从墨西哥和美国病人体内分离得到新型病毒，该病毒属于正粘病毒科(Ortho-myxoviridae)流感病毒属 A 型流感病毒。从基因组成来看，该病毒的基因组分来源于北美猪流感病毒北美禽流感病毒、人类甲型流感 H1N11 亚型病毒和常见于亚洲欧洲的猪流感病毒。该病毒爆发初期，常被称作猪流感，另还有猪源流感、人类猪(型)流感、墨西哥流感、北美流感 H1N1 新型流感、新流感、以及 2009 年 H1N1 流感。2009 年 4 月 30 日世界卫生组织将该病毒改称为甲型 H1N1 流感病毒。本产品就是以探针法 qRT-PCR 技术为基础开发的专门检测甲型 H1N1(2009)流感病毒检测 RNA 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，分析灵敏度高，可以达到 100 拷贝/反应。
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 H1N1(2009)流感病毒检测 RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
5. 既用于定性检测，又用于定量检测。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 25 μL 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

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
探针法 qRT-PCR 缓冲液	990504a	650 μL	1.5 mL 蓝盖管
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	990504bv2	50 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
国境口岸甲型 H1N1(2009)流感病毒检测 qRT-PCR 引物-探针干粉	yp15-15919-15901-SN	50 次	0.5 mL 棕色管
国境口岸甲型 H1N1(2009)流感病毒检测 qRT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	pc15919-15901-SN	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	sc15-15919-15901-SN	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 165 μL 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 24 个月。

自备试剂

样品 RNA。

使用方法

一、稀释标准曲线样品（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，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。如果需要 RNA 阳性样品，需要另外订购。

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 μL 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 μL 1E7 拷贝/μL 的阳性对照(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. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

二、样品 RNA 的制备

6. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10 μL 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次样本制备所要求的起始样本体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。
7. 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（25 μL 体系，在样品制备室进行）

8. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 个 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照(用水做模板)，6 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 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 RT-PCR 阳性对照（直接用第 5 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
9. 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	RT-PCR 阴性对照	标准曲线样品管 （1-6 管）

探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 12.5 μL	12.5 μL	各 12.5 μL
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	各 1 μL	1 μL	各 1 μL
甲型流感病毒 N1 亚型 qRT-PCR 引物-探针混合液	各 0.8 μL	0.8 μL	各 0.8 μL
N+2 个待测 RNA 样本	各 5 μL	不加	不加
超纯水	各 5.7 μL	10.7 μL	各 5.7 μL
第 5 步所得标准曲线样品稀释液（1-6 号）	不加	不加	各 5 μL（2 号样到 2 号管，3 号样到 3 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	45℃	25 min
变性	95℃	2 min
预扩增 （5 个循环）	95℃	15 sec
	50℃	30 sec
	72℃	45 sec
扩增及荧光收集 （40 个循环）	95℃	15 sec
	60℃	45 sec（采集 HEX 通道的荧光信号，淬灭基团为 BHQ）

四、数据处理

11. 阴性对照 Ct 值应显示 0，阳性对照 Ct 值≤36 并有明显的扩增曲线，否则此次检测结果无效，需重做。
12. 如果阴性对照和阳性对照均正常，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，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。
14. 检测样品的 Ct 值≤36，具有明显的扩增曲线，结果有效，可直接报告甲型 H1N1(2009)流感病毒核酸检测阳性。
15. 检测样品 36≤Ct 值≤40，需进行一次重复实验，若 Ct 值仍介于 36 和 40 之间，且曲线有明显的指数增长特性，可报告甲型 H1N1(2009)流感病毒核酸检测阳性，否则报告甲型 H1N1(2009)流感病毒核酸检测阴性。

关联产品	甲型流感病毒(禽流感病毒)H1N1 亚型双重探针法 qRT-PCR 检测及分型试剂盒