天净沙系列

CAT#:15-15930-15902

低温运输，-20℃保存

天净沙

甲型流感病毒 H3N2 亚型双重探针法 RT-PCR 试剂盒

Influenza Virus A H3N2 Probe RT-PCR Kit

使用手册 V1.01

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）是单股负链 RNA 病毒，总序列长度约为 13500 nt。该病毒主要通过飞沫传播。其中，H3N2 是甲型流感病毒的一个亚型，感染症状与普通人流感相似，包括发热、咳嗽、喉咙痛、身体疼痛、头痛、发冷和疲劳等，有些还会出现腹泻和呕吐，重者会继发肺炎和呼吸衰竭，甚至死亡。因此快速检测甲型流感病毒 H3N2 亚型具有重要的意义。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流感病毒 H3N2 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. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 1000 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 H3N2 亚型高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
5. 可用于定性检测，不推荐用于定量检测。
6. 甲型流感病毒 H3N2 亚型探针分别用 Cy5 和 FAM 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

本产品使用十孔盒包装

成分	编号	规格	包装材料
探针法 qRT-PCR 缓冲液	990504a	500 μL	0.5 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
甲型流感病毒 H3N2 亚型 RT-PCR 引物-探针干粉	yp15-15930-15902	50 次	0.5 mL 棕色管
甲型流感病毒 H3 亚型 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc15930-PV222260-HA1	50 μL	0.5 mL 黄盖管
甲型流感病毒 N2 亚型 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc15902-PV584926-NA	50 μL	0.5 mL 白盖管
使用手册	15-15930-15902sc	1 份	无

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、样品 RNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，最好设置 N+3 个提取，多出的两个分别是甲型流感病毒 H3 和 N2 亚型的 PPC（样品制备阳性对照），一个是 PNC（样品制备阴性对照）。可以用自备的、确定是阳性的样本作为 PPC，可以用自备的、确定是阴性的样本作为

PNC。如没有，可以用10 μL本产品提供的甲型流感病毒H3亚型阳性对照（1E4拷贝/μL）和甲型流感病毒 N2 亚型阳性对照（1E4 拷贝/μL）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PPC 样本。另外用水作为 PNC，水的总体积需要跟样本制备试剂盒所要求的样本体积一样。

2. 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。

二、Probe RT-PCR反应（20 μL体系，在样品制备室进行）

3. 首次使用本试剂盒时，需要将 RT-PCR 引物-探针干粉管短暂离心，然后在离心管中加入165 μL的超纯水并涡旋混匀30秒得引物-探针混合液，放冰上待用。未用完的此溶液需要-20℃保存。

4. 如果只做1次重复，则标记N+3+3个PCR管，其中N+3个用于上步得到的N+3个样品，另外两个分别用于甲型流感病毒 H3 和 N2 亚型的扩增阳性对照（APC），1个用于扩增阴性对照（ANC，用水做模板）。

5. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列一次重复。样品管和阴性对照设置完毕才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上并储存好后最后加）：

成分	N+3个样品管	ANC管	H3亚型APC管	N2亚型APC管
探针法qRT-PCR缓冲液	各10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
探针法qRT-PCR酶混合液v2	各1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
甲型流感病毒H3N2亚型RT-PCR引物-探针混合液	各3 μL	3 μL	3 μL	3 μL
N+3个待测RNA	各6 μL	不加	不加	不加
超纯水	不加	6 μL	不加	不加
甲型流感病毒H3亚型阳性对照（1E4拷贝/μL）	不加	不加	6 μL	不加
甲型流感病毒N2亚型阳性对照（1E4拷贝/μL）	不加	不加	不加	6 μL

6. 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℃	10 min
预变性	95℃	10 min
RT-PCR反应（45个循环）	95℃	15 sec
	60℃	60 sec（采集FAM通道和Cy5通道的荧光信号，淬灭基

		团为 TAMRA 和 BHQ3）

注：部分（如：伯乐 CFX96）机型如果两步法效果不理想可采用三步法：50℃ 10 分钟， 95℃ 10 分钟，（95℃ 15 秒、51℃ 30 秒、72℃ 30 秒）循环 45 次，每个循环第三步采集荧光信号。

三、数据处理

7. 根据以下表格，判断所有对照反应结果的阳性或阴性：

信号通道	判断标准	结果
FAM	Ct 值小于 40 且扩增曲线呈倒 S 型	FAM 阳性
	Ct 值大于等于 40	FAM 阴性
	无 Ct 值	FAM 阴性
Cy5	Ct 值小于 40 且扩增曲线呈倒 S 型	Cy5 阳性
	Ct 值大于等于 40	Cy5 阴性
	无 Ct 值	Cy5 阴性

8. 制备实验有效性判断：若两个 PPC 分别为 FAM 及 Cy5 阳性且 PNC 为 FAM 和 Cy5 阴性，则 RNA 制备实验有效，可继续后续分析。若甲型流感病毒 H3 亚型 PPC 为 Cy5 阴性或甲型流感病毒 N2 亚型 PPC 为 FAM 阴性，则整个 RNA 制备实验无效，无需进行后续分析，必须重复 RNA 制备实验。导致纯化失效的可能原因包括：RNA 制备试剂盒失效、制备实验操作失误、PCR 仪器故障，或 PNC 样本受到既往实验残留污染或其他阳性样本交叉污染。
9. 扩增实验有效性判断：若甲型流感病毒 H3 亚型 APC 为 Cy5 阳性，甲型流感病毒 N2 亚型 APC 为 FAM 阳性，且 ANC 为 FAM 和 Cy5 阴性，则 RT-PCR 扩增实验有效，可继续后续分析。若甲型流感病毒 H3 亚型 APC 为 Cy5 阴性，或甲型流感病毒 N2 亚型 APC 为 FAM 阴性，或 ANC 为 FAM 或 Cy5 阳性，则整个 RT-PCR 扩增实验无效，无需进行后续分析，必须查明扩增失败原因。可能原因包括：RT-PCR 试剂失效、PCR 仪器故障、ANC 样本受到既往实验残留污染或其他阳性样本交叉污染。
10. 若制备与扩增实验均有效，则进行样本结果分析。如果某待测样品 Cy5 Ct 大于或等于 40，则为甲型流感病毒 H3 亚型阴性；如果小于 40 则为甲型流感病毒 H3 亚型阳性。如果某待测样本的 FAM Ct 大于或等于 40，则为甲型流感病毒 N2 亚型阴性；如果小于 40 则为甲型流感病毒 N2 亚型阳性。

关联产品	甲型流感(禽流感)病毒 N2 亚型探针法 qRT-PCR 试剂盒