天净沙系列

CAT#:15-15919-15901

低温运输，-20℃保存

天净沙

甲型流感病毒 H1N1 亚型双重探针法 RT-PCR 试剂盒

Influenza Virus A H1N1 Duplex Probe RT-PCR Kit

使用手册 V1.0

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

甲型流感病毒容易发生变异，流感大流行就是甲型流感病毒出现新亚型或旧亚型重现引起的。甲型流感病毒是 A 型流感病毒，根据 H 和 N 抗原不同，又分为许多亚型，H 可分为 18 个亚型，N 可分为 11 个亚型。其中导致人类感染甲型流感病毒主要是 H1N1。人感染甲型流感病毒后的早期症状与普通流感相似，有些还会出现腹泻或呕吐、肌肉痛或疲倦、眼睛发红等。由于人群对甲型流感病毒普遍易感，并可以人传染人，因此快速检测甲型流感病毒 H1N1 亚型对甲型流感病毒的及早发现，避免其大范围传播具有重要意义。本产品就是以探针法 qRT-PCR 技术为基础开发的对甲型流感病毒 H1 亚型和 N1 亚型的分型检测的试剂盒，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 N1 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. 可用于定性检测，不推荐用于定量检测。
6. H1 和 N1 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 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 H1N1 亚型 RT-PCR 引物-探针干粉	yp15-15919-15901	50 次	0.5 mL 棕色管
甲型流感病毒 H1 亚型 阳性对照(1E4 拷贝/mL)	pc15919-PV978735-HA1	50 μL	0.5 mL 黄盖管
甲型流感病毒 N1 亚型 阳性对照(1E4 拷贝/mL)	pc15901-PV792607-NA	50 μL	0.5 mL 白盖管
使用手册	15-15919-15901sc	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 H1 和 N1 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 H1 阳性对照（1E4 拷贝/μL）和 N1 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 H1 和 N1 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	H1 APC 管	N1 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 H1N1 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 H1 亚型阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	6 μL	不加
甲型流感病毒 N1 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℃	5 min
RT-PCR 反应	95℃	15 sec

（45 个循环）	51℃	30 sec
	72℃	30 sec（采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团分别为 TAMRA 和 BHQ3）

注：部分（如：伯乐 CFX96）机型如果三步法效果不理想可采用两步法：50℃ 10 分钟， 95℃ 5 分钟，(95℃ 15 秒、60℃ 60 秒）循环 45 次，每个循环第二步采集荧光信号。

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 38 且扩增曲线呈倒 S 型	FAM 阳性
	Ct 值大于等于 38	FAM 阴性
	无 Ct 值	FAM 阴性
Cy5	Ct 值小于 38 且扩增曲线呈倒 S 型	Cy5 阳性
	Ct 值大于等于 38	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 H1 PPC 为 Cy5 阴性或 N1 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 H1 APC 为 Cy5 阳性，N1 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 H1 APC 为 Cy5 阴性，或 N1 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 38，则为 H1 阴性；如果小于 38 则为 H1 阳性。如果某待测样本的 FAM Ct 大于或等于 38，则为 N1 阴性；如果小于 38 则为 N1 阳性。

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