

甲型流感病毒H3亚型探针法qRT-PCR试剂盒

Influenza Virus A H3 Probe qRT-PCR Kit

CAT#: BN63432

低温运输, -20℃保存

产品及特点

甲型流感病毒(Influenza Virus A), 也称禽流感病毒, 是一种常见负链RNA流感病毒, 其病毒颗粒包含了8段不同的RNA基因。在病毒颗粒的表面, 存在两种最为主要的蛋白质, 即血凝素(Hemagglutinin, H)和神经氨酸酶(Neuraminidase, N), 它们决定了病毒的亚型。其中, 甲型流感病毒H3亚型主要在人群中广泛传播。甲型流感病毒H3亚型的H蛋白质允许病毒侵入宿主细胞, 而N蛋白质则有助于病毒释放出宿主细胞。这两种蛋白质也是流感病毒的主要抗原, 它们决定了病毒的免疫原性和毒力。甲型流感病毒H3亚型感染人类会引发禽流感, 该病症状主要表现为高热、咳嗽、流涕、肌痛等, 多数伴有严重的肺炎, 严重者心、肾等多种脏器衰竭导致死亡, 病死率很高。因此快速灵敏诊断甲型流感病毒H3亚型具有重要意义。本产品以探针法荧光定量RT-PCR技术为基础开发的专门检测甲型流感病毒H3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100拷贝/ μL 。
3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。
4. 特异性高, 引物是根据甲型流感病毒H3亚型RNA高度保守区设计, 不会跟其他的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. 本产品足够50次20 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RT-PCR缓冲液	60001	0.5 mL	0.5 mL
探针法RT-PCR酶混合液v2	60002	50 μL	0.5 mL
荧光PCR模板专用稀释液	60003	1 mL	1.5 mL

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

	超纯水	60004	1 mL	1.5 mL
	甲型流感病毒H3亚型 qRT-PCR引物-探针干粉	63432-5	50 次	1.5 mL
	甲型流感病毒H3亚型 qRT-PCR阳性对照 (1×10^7 拷贝/ μ L)	63432-6	50 μ L	0.5 mL
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165uL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。			
自备试剂	样品RNA，超纯水。			
使用方法	一、稀释标准曲线样品（以$10E1$-$10E6$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。 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45μL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5μL1×10^7拷贝/μL的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得1×10^6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5μL1×10^6拷贝/μL的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10^5拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。 5. 换枪头，在4号管中加入5μL1×10^5拷贝/μL的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10^4拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。 6. 重复上面的操作直到得到6稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。 二、样品RNA的制备 7. 如果有N个样品，最好设置N+2个提取，多出的一个是样品制备PC（样品制备阳性对照），一个是样品制备NC（样品制备阴性对照）。可以用10μL阳性对照的10000倍稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为样品制备PC。另外用水作为样品制备NC。 8. 用自选方法纯化样品的RNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒RNA提取试剂盒兼容。			

三、设置qRT-PCR反应（20μL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+9个PCR管，其中N+2个用于上步得到的N+2个样品，1个用于PCR阴性对照（用水做模板），5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PCR管，其中N+2个用于上步得到的N+2个样品，1个用于PCR阴性对照（用水做模板），1个用于PCR阳性对照（用试剂盒提供的阳性对照的10000倍稀释液做模板）。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。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	PCR阴性 对照管	标准曲线 样品管（1-6管）
探针法qRT-PCR缓冲液	10μL	10μL	各10μL
探针法qRT-PCR酶混合液	2μL	2μL	各2μL
甲型流感病毒H3亚型探针法 qRT-PCR引物-探针混合液	3μL	3μL	各3μL
N+2个待测RNA模板	5μL	不加	不加
超纯水	不加	5μL	不加
第6步所得标准曲线样品稀释 液（2-6号）	不加	不加	各5 μL（1号样到 1号管，2号样到2 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℃	5 min
PCR反应 (40个循环)	95℃	15sec
	60℃	60sec（采集FAM通道的荧光信号， 淬灭基团为BHQ1）

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，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。

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. 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。

15. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照必须无Ct或Ct大于或等于35。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct值应该小于35，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无Ct或Ct大于或等于35，则为阴性。如果Ct小于35则为阳性。