

## 甲型流感病毒 H16N5 亚型双重探针法 qRT-PCR 检测及分型试剂盒

Influenza Virus A H16N5 Probe qRT-PCR Kit (with internal control)

**目录号: ml108074**

# 使 用 说 明 书

### 产品及特点

甲型流感病毒(Influenza A Virus)是常见流感病毒(简称禽流感),甲型流感病毒某些亚型,如 H16N5 亚型,可以引起急性呼吸道传染病,即甲型流感,其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。此病可通过消化道、呼吸道、皮肤损伤和眼结膜等多种途径传播,严重威胁人类健康,因此快速检测甲型流感 H16N5 亚型具有重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测甲型流感 H16N5 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/反应。
3. 提供阳性对照和内参,便于排除假阴性结果。
4. 特异性高,引物是根据甲型流感 H16N5 病毒 RNA 高度保守区设计,不会跟其他生物的 RNA

|       |                                                                                                                                     |       |           |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----------|
|       | <p>发生交叉反应。</p> <p>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 各数量级。</p> <p>6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。</p> <p>7. 本产品只能用于科研。</p> |       |           |
| 规格及成分 | 成分                                                                                                                                  | 规格    | 包装        |
|       | 探针法 qRT-PCR 缓冲液                                                                                                                     | 500μL | 0.5mL 蓝盖管 |
|       | 探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2                                                                                                                 | 50μL  | 0.5mL 红盖管 |
|       | 荧光 PCR 模板专用稀释液                                                                                                                      | 1mL   | 1.5mL 绿盖管 |
|       | H16N5 亚型 qRT-PCR 引物-探针干粉 (含内参探针)                                                                                                    | 50 次  | 1.5mL 棕色管 |
|       | H16 亚型 qRT-PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)                                                                                                   | 50μL  | 0.5mL 黄盖管 |
|       | N5 亚型 qRT-PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)                                                                                                    | 50μL  | 0.5mL 白盖管 |
|       | 人基因组 DNA 内参阳性对照(1×10E4 拷贝/μL)                                                                                                       | 50μL  | 0.5mL 橙盖管 |
|       | 使用手册                                                                                                                                | 1 份   | 无         |
|       | 本产品采用十一孔盒包装                                                                                                                         |       |           |
|       | <p><b>注意：</b>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 216uL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。</p>                                                       |       |           |
| 使用方法  | <p><u>一、稀释含内参的 H16 标准曲线样品，是否做 H16 标曲由客户决定。</u></p>                                                                                  |       |           |
|       | <p>1. 标记 6 个离心管，分别为 A6，A5，A4，A3，A2，A1，A0。</p>                                                                                       |       |           |
|       | <p>2. 在 A0 号管中加入 280μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，35μL 本试剂盒提供的人基因组 DNA 内参 (35000 拷贝)，震荡一分钟混匀。内参浓度为 1111 拷贝/μL。</p>                              |       |           |
|       | <p>3. 用带芯枪头分别将上步得到的混合液按 45μL/管加入到标记的 A1-A6 号管中，用带芯枪头（下</p>                                                                          |       |           |

同)。

4. 在 A6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的 H16 阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的 H16 标准曲线样品, 内参浓度为 1000 拷贝/ $\mu\text{L}$ 。放冰上待用。

5. 换枪头, 在 A5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的 H16 标准曲线样品, 内参浓度为 1000 拷贝/ $\mu\text{L}$ 。放冰上待用。

6. 换枪头, 在 A4 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的 H16 标准曲线样品, 内参浓度为 1000 拷贝/ $\mu\text{L}$ 。放冰上待用。

## 二、稀释含内参的 N5 标准曲线样品, 是否做 N5 标曲由客户决定。

8. 操作同上, 只是使用 N5 的 PC 作为模板。得到 6 个浓度的样本放冰上待用, 内参浓度均为 1000 拷贝/ $\mu\text{L}$ , 分别是 B1-B6

## 二、样品 RNA 的制备

9. 用自选方法纯化 N 个样品的 RNA。由于本试剂盒的这个版本只提供 DNA 作为内参, 因此不能监控纯化过程。

## 二、Probe qRT-PCR 反应 (本试剂提供的内参为 DNA, 只能监控 PCR 过程)

10. 如果做定量分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+1+6+6 个 RT-PCR 管, 其中 N 个管用于上步得到的 N 个样品, 1 个用于 RT-PCR 阴性对照 (用水做模板), 6 个用于 H16 的标准曲线, 另外 6 个用于 N5 的标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+3 个 RT-PCR 管, 其中 N 个管用于上步得到的 N 个样品, 1 个用于 RT-PCR 阴性对照 (用水做模板), 1 个用于 H16 RT-PCR 阳性对照, 1 个用于 N5 RT-PCR 阳性对照 (直接用第一步和第二步所得的两个 4 号稀释液作为模板)。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

11. 在标记管中按下表加入各成分 (本表只列出一次重复) :

| 成分 | 样品管 N 个 | RT-PCR 阴性 | 标曲样品管 | 标曲样品管 |
|----|---------|-----------|-------|-------|
|----|---------|-----------|-------|-------|

|                                 |        | 对照   | (A1-A6) | (B1-B6) |
|---------------------------------|--------|------|---------|---------|
| 探针法 qRT-PCR 缓冲液                 | 各 10μL | 10μL | 10μL    | 各 10μL  |
| 探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2             | 各 1μL  | 1μL  | 各 1μL   | 各 1μL   |
| H16N5RT-PCR 引物-探针混合液 (含内参引物和探针) | 各 4μL  | 4μL  | 各 4μL   | 各 4μL   |
| N 个待测 RNA                       | 各 5μL  | 不加   | 不加      | 不加      |
| 超纯水                             | 不加     | 5μL  | 不加      | 不加      |
| 第一步所得标准曲线样品稀释液 (A1-A6 号)        | 不加     | 不加   | 各 5μL   | 不加      |
| 第二步所得标准曲线样品稀释液 (B1-B6 号)        | 不加     | 不加   | 不加      | 各 5μL   |

**12. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 RT-PCR:**

| 过程                 | 温度   | 时间                                                          |
|--------------------|------|-------------------------------------------------------------|
| 预变性                | 50°C | 10min                                                       |
| PCR 反应<br>(45 个循环) | 95°C | 10min                                                       |
|                    | 95°C | 15sec                                                       |
|                    | 60°C | 45 sec (采集 FAM 通道、HEX 通道和 Texas Red 三个通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA) |

**四、数据处理**

**13.** 如果扩增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。

**14.** 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。

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              | <p><b>15.</b> 对定量检测，以标曲样本浓度的 log 值为横轴，分别以 H16 阳性对照（FAM 通道）和 N5 阳性对照（HEX 通道）的 Ct 值为纵轴，绘制两条标准曲线，R2 必须大于 0.95。再以待测样品的 Ct 值从分别从两条标准曲线上推算出对应样品 RNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。</p> <p><b>16.</b> 对定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照 FAM 通道的 Ct 必须大于或等于 40。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 H16 阴性，如果小于或等于 35 则为 H16 阳性。如果其 HEX 通道的 Ct 大于或等于 40 则为 N5 阴性，如果小于或等于 35 则为 N5 阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性，如果小于 40，则为阳性。</p> <p><b>17.</b> 对 H16 或 N5 阴性样本，如果内参为阳性（Texas Red 荧光通道有信号，信号有对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于或等于 35），则判断为真阴性。如果内参为阴性（TET 荧光通道没有信号，信号没有对数增长，没有典型扩增曲线，Ct 值大于 35），则不能判断，本样本需要重复。对 H16 或 N5 阳性样本，不需要分析内参的结果。</p> |
| <b>自备试剂</b>  | 样品 RNA。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>运输及保存</b> | 低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |