



## 甲型流感(禽流感)病毒 H5N1 亚型探针法荧光定量

### RT-PCR 试剂盒

#### 产品及特点:

H5N1 是甲型流感(禽流感)病毒的一种亚型, 为 RNA 病毒。流感病毒颗粒外膜由两型表面糖蛋白覆盖, 一型为植物血凝素(即 H), 一型为神经氨酸酶(即 N), H 又分 16 个亚型, N 分 9 个亚型。所有人类的流感病毒都可以引起禽类流感, 但不是所有的禽流感病毒都可以引起人类流感, 现在已经确认能够感染人的禽流感病毒共有 8 种, 包括 H5N1、H5N2、H7N2、H7N3、H7N7、H9N2、H10N7, 以及最近的 H7N9。禽类流感根据其致病性可分为高致病性和低致病性, H5N1 为高致病性禽流感病毒。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 H5N1 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, 灵敏性高。
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(禽流感)病毒 H5N1 亚型高度保守区设计, 不会跟其他病毒的 RNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的探针法荧光定量 RT-PCR 反应。
6. 本产品只能用于科研。

#### 规格及成分:

编号	成分	规格
----	----	----



试剂一	探针法 qRT-PCR 缓冲液	500 $\mu$ L (蓝盖)
试剂二	探针法 qRT-PCR 酶混合液	100 $\mu$ L (红盖)
试剂三	荧光 PCR 专用模板稀释液	1 mL (黄盖)
试剂四	甲型流感(禽流感)病毒 H5N1 亚型探针法 qRT-PCR 引物混合液	100 $\mu$ L (白盖)
试剂五	甲型流感(禽流感)病毒 H5N1 亚型 qRT-PCR 探针	50 $\mu$ L (棕色管)
试剂六	甲型流感(禽流感)病毒 H5N1 亚型探针法 qRT-PCR 阳性对照( $1 \times 10^8$ / $\mu$ L)	50 $\mu$ L (黄盖)
使用手册		1 份

## 运输及保存:

低温运输,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存, 保存期限为 12 个月。

## 自备试剂:

样品 RNA。

## 使用方法:

### 一、稀释标准曲线样品 (以 $10^2$ - $10^7$ 拷贝/ $\mu$ L 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 7, 6, 5, 4, 3, 2。
2. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu$ L 荧光 RT-PCR 专用模板稀释液, 最好用带芯枪头, 下同)。
3. 在 7 号管中加入 5  $\mu$ L  $1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 6 号管中加入 5  $\mu$ L  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 5 号管中加入 5  $\mu$ L  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu$ 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/ $\mu$ L 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 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

## 二、样品 DNA 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 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 $\mu$ L 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 PC。另外用水作为 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。

也可以选购本公司的柱式病毒 RNAout。

## 三、Probe qRT-PCR 反应 (20 $\mu$ L 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), 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 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。

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) :

成份	样品管 N+2 个	RT-PCR 阴 性对照管	标准曲线样品管 (2-7 管)
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	各 10 $\mu$ L
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	各 2 $\mu$ L
甲型流感(禽流感)病毒 H5N1 亚型 qRT-PCR 探针	各 1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	各 1 $\mu$ L
甲型流感(禽流感)病毒 H5N1 亚型探针 qRT-PCR 引物混合液	各 2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	各 2 $\mu$ L
待测样品 RNA 模板	各 5 $\mu$ L	--	--



超纯水	--	5 $\mu$ L	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)	不加	不加	各 5 $\mu$ L (2号样到2号管, 3号样到3号管)

11. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 qRT-PCR:

过程	温度	时间
逆转录	50°C	30 min
预变性	94°C	10 min
qRT-PCR 反应 35 个循环	94°C	15 sec
	60°C	1 min, (采集 FAM 通道的荧光信号)

#### 四、数据处理:

12. 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。

13. 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 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长, 有典型扩增曲线, Ct 值应该小于或等于 30。对待测样品, 如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性, 如果小于或等于 35 则为阳性。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。

**上海纪宁实业有限公司([www.shjning.com](http://www.shjning.com))所有产品仅供科研使用, 不得用于其他用途。**



上海纪宁生物

[www.shjning.com](http://www.shjning.com)

仅供科研使用