



马流感病毒 H3N8 亚型探针法荧光定量

RT-PCR 试剂盒

产品及特点:

马流感(Equine influenza,EI)是由马流感病毒(Equine Influenza Virus)引起马的一种急性高度接触传染性、群发性呼吸道疾病,类似于人流感,典型的临床症状为突发高热、咳嗽、呼吸困难、食欲减退。马流感病毒(Equine influenzavirus,EIV)属正粘病毒科 A 型流感病毒,H3N8 每年都有发生。潜伏期为 2~10 天,多在经感染 3~4 天后发病。所有病马在发热时都呈现全身症状。病马呼吸、脉搏频数,食欲降低,降神委顿,眼结膜充血水肿,大量流泪。由 H3N8 亚型所致的疾病例能观察到细支气管炎或扩散而呈支气管炎、肺炎和肺水肿。因此快速灵敏诊断具有重要意义。本产品就是以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测马流感病毒 H3N8 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,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,引物是根据马流感病毒 H3N8 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 μ 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 μ L(蓝盖)
试剂二	探针法 qRT-PCR 酶混合液	100 μ L(红盖)
试剂三	荧光 PCR 专用模板稀释液	1 mL(黄盖)
试剂四	马流感病毒 H3N8 亚型探针法 qRT-PCR 引物混合液	100 μ L(白盖)
试剂五	马流感病毒 H3N8 亚型 qRT-PCR 探针	50 μ L(棕色管)
试剂六	马流感病毒 H3N8 亚型探针法 qRT-PCR 阳性对照 (1×10^8 / μ L)	50 μ L(黄盖)
	使用手册	1 份

运输及保存:

低温运输, -20°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/ μ 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 μ 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 μ L 1×10^8 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^7 拷贝/ μ 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 μ L 1×10^7 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^6 拷贝/ μ 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 μL 1×10^6 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。
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 μL 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 μL 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 μL	10 μL	各 10 μL
探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2 μL	2 μL	各 2 μL
马流感病毒 H3N8 亚型 qRT-PCR 探针	各 1 μL	1 μL	各 1 μL



马流感病毒 H3N8 亚型探针 qRT-PCR 引物混合液	各 2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
待测样品 RNA 模板	各 5 μ L	--	--
超纯水	--	5 μ L	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)	不加	不加	各 5 μ 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)所有产品仅供科研使用, 不得用于其他用途。

