甲型流感(禽流感)病毒 H5N2 亚型染料法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

产品及特点 ：

1. 一站式，用于不需要单独准备每种成分，包括引物和对照。

2. 根据甲型流感(禽流感)病毒 H5N2 亚型的保守基因序列设计的引物，具有良好的特异性。

3. 基于染料法 qRT-PCR 检测，灵敏度比常规 RT-PCR 高 10-100 倍，可以达到至少 1000 拷贝/反应。

4. 使用一管式 qRT-PCR 技术，RT 和 PCR 两步在一个试管内完成，不需要中间转移样品，降低了操作误差和可能的污染。

5. 本产品足够 50 次 30μL 体系的 RT-PCR。

规格及成分：

编号	成分	规格
试剂一	2×qRT-PCR 缓冲液	500 μL(棕色管)
试剂二	10×qRT-PCR 酶混合液	100 μL(红盖)
试剂三	ROX 染料 I，50×	20 μL(棕色管)
试剂四	ROX 染料 II，50×	20 μL(棕色管)
试剂五	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL(黄盖)
试剂六	甲型流感(禽流感)病毒 H5N2 亚型染料法 qRT-PCR 引物混合液	100 μL(白盖)
试剂七	甲型流感(禽流感)病毒 H5N2 亚型染料法 qRT-PCR 阳性对照（1×10E8 拷贝/μL)	50 μL(黄盖)
试剂八	沙核酸释放剂(试用装)	20 次(1mL，绿盖)
试剂九	使用手册	1 份

运输及保存：

低温运输、-20℃保存，有效期一年。

阳性对照需要因易污染其他成分需要单独放置。本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供 DNA 片段作为阳性对照。

自备试剂：

样品 RNA。

使用方法：

一、稀释阳性对照：

以 10E2-10E7 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。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原。

1. 标记 6 个离心管，分别为 7，6，5，4，3，2。用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同)。

2. 在 7 号管中加入 5 μL 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照(本试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。

3. 换枪头，在 6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。

4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备：

5. 如果有 N 个样品，必须设置 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 10μL 上步制备的阳性对照梯度稀释液中的第 4 号(浓度为 1×10E4 拷贝/μL，10μL 相当于 1 万拷贝)再加上一定量的水作为制备的阳性对照(加水后其总体积跟样品一样，样品体积多少取决于所用试剂盒的要求)。可以用水作为制备的阴性对照。

6. 用自选方法纯化 N+2 个样品的 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 RT-PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）：

7. 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，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 号阳性对照稀释液做模板)。下面只描述定量分析的步骤，定性分析只是把 6 个标曲反应缩减成 1 个，其余不变。

8. 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，阳性对照样品要等所有管子盖上盖子后最后加)：

成分	N+2 个制备所得样品	qRT-PCR 阴性对照	qRT-PCR 阳性对照(2-7 管)
2×qRT-PCR 缓冲液	10μL	10 μL	各 10 μL
甲型流感(禽流感)病毒 H5N2 亚型染料法 qRT-PCR 引物混合物	2 μL	2 μL	各 2 μL
50×ROX (见注)	0.4μL	0.4μL	各 0.4μL
样品制备所得 RNA 模板(来于第 8 步)	5.6μL	--	--
稀释所得 6 个阳性对照(来于第 6 步)	--	--	各 5.6μL(2 号样到 2 号管，3 号样到 3 号管...)
超纯水	--	5.6μL	--
10×qRT-PCR 酶混合液	2μL	2μL	2μL

注： 需使用 ROX 染料 I 的机型：ABI Prism7000、7300、7700、7900HT、Step-One、Step-One Plus。

需使用 ROX 染料 II 的机型：：ABI Prism 7500、7500Fast、MJ Research 的 Chromo4、Opticon(II)Corbett Rotor Gene 3000。

不需要使用 ROX 的机型：Thermal Cycle Dice Real Time System，LightCycler、Smart Cycler System、Agilent Mx3000P、RotorGene3000、RotorGene 6000。

9. 上机后按下面参数进行 RT-PCR(参数可能会因仪器不同而需优化)。

过程	温度	时间
RT(逆转录)	50℃	15-30 min
预变性	95℃	5 min
Qrt-PCR 反应 40 个循环	95℃	15 sec
	58℃	1 min,(采集 FAM 通道的荧光信号)
按仪器预设程序进行溶解曲线分析		

四、数据处理：

10. 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 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。

11. 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。