

马流行性感冒病毒（马甲 1 型和马甲 2 型）荧光 RT-PCR

检测试剂盒说明书

Method of the real-time RT-PCR for the detection of Equine Influenza Virus

(50 reactions)

1、试剂盒简介

货号：HB-512

马流感是马、驴和骡的一种急性呼吸道疫病，由正黏病毒科 A 型流感病毒属中的两个 A 型流感病毒亚型引起，分别为 H7N7（曾称为马-1 型）和 H3N8（曾称为马-2 型）。禽流感病毒被认为是两种亚型马流感病毒的祖先，易感马科动物的临床症状表现为发热、刺耳地干咳和鼻流黏性脓性分泌物。

本试剂盒是依据 OIE3.5.7 章马流感诊断国际标准中马流感国际参考实验室推荐的针对 M 基因可以同时监测 H7N7 和 H3N8 等马流感病毒亚型的引物和探针序列，优化反应参数配套生产，探针的 5' 端和 3' 端分别标记不同的荧光素，如 5' 端标记 FAM 荧光素，3' 端是 TAMRA 修饰。

2、试剂盒组成

核酸扩增试剂具体组成参见表 1：

表 1：试剂盒组成（50test/盒）

试剂盒组成成分	体积
核酸扩增试剂：	
DEPC 水	1ml × 1 管
马流感荧光 RT-PCR 反应液	750μL × 1 管
酶混合物	55μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
马流感荧光阳性对照	1ml × 1 管

（注：推荐使用提取核酸更快捷方便的《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》）

3、样本采集, 存放及运输

3.1 样本采集：所用取样器材必须经高压灭菌并烘干。

用于检测多种样本（如肌肉、脏器、鼻或咽喉拭子、血清或血浆、组织渗出液等）中马流感病毒的 RNA。

3.2 存放：样品应尽快研磨提取核酸进行检测，-70 °C 以下可长期保存，但应避免反复冻融。

3.3 运输：采用冰壶或泡沫箱加冰密封进行运输。

4、荧光 RT-PCR 检测

4.1 操作方法

4.1.1 样本的处理（在样本制备区进行）：

公司地址：北京市顺义区南法信顺畅大道 14 号院东亚首航国际 1 号楼 3 层 329 室

公司网址：www.halcyonbio.com

邮 箱：haisentong@126.com

电话：010-50933955, 13718421576, 18610566381

客服 QQ：737481857 1632557907

- 4.1.1.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和（阳性对照、阴性对照在试剂盒中已标出），做标记。（注：试剂盒中的阳性对照吹打混匀后直接作为 PCR 检测的模板，无需提取核酸）
- 4.1.1.2 每管加入 600 μL 裂解液，分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各 200 μL ，一份样本换用一个吸头，再加入 200 μL 氯仿，混匀器上振荡混匀 5 s（不能过于强烈，以免产生乳化层，也可以用手颠倒混匀），于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 15 min。
- 4.1.1.3 取与 4.1.1.1 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，加入 500 μL 异丙醇（-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷），做标记。吸取 4.1.1.2 各管中的上清液转移至相应的管中，上清液应至少吸取 500 μL ，不能吸出中间层，颠倒混匀。
- 4.1.1.4 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清，倒置于吸水纸上，沾干液体（不同样品须在吸水纸不同地方沾干）；加入 600 μL 75% 乙醇，颠倒洗涤。
- 4.1.1.5 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清，倒置于吸水纸上，尽量沾干液体（不同样品须在吸水纸不同地方沾干）。
- 4.1.1.6 4 000 r/min 离心 10s（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），将管壁上的残余液体甩到管底部，小心倒去上清，用微量加样器将其吸干，一份样本换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面，室温干燥 3 min，不能过于干燥，以免 RNA 不溶。
- 4.1.1.7 加入 33 μL DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2 000 r/min 离心 5 s，冰上保存备用。提取的 RNA 须在 2 h 内进行 PCR 扩增；若需长期保存须放置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内。
【推荐使用《《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》》，更方便快捷高效提取核酸】。
- 注：提取的 RNA 须在 2 h 内进行 PCR 扩增；若需长期保存须放置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内。

4.1.2 检测

4.1.2.1 扩增试剂准备（在反应混合物配制区进行）：

从试剂盒中取出相应的荧光 RT-PCR 反应液、酶混合物，在室温下融化后，2000 r/min 离心 5 s。设所需荧光 RT-PCR 检测总数为 n，其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和，每个样品测试反应体系配制见表 2：

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	RT-PCR 反应液	酶混合物
用量	15 μL	1.0 μL

根据测试样品的数量计算好各试剂的使用量，加入到适当体积试管中，充分混合均匀，向每个荧光 RT-PCR 管中各分装 15 μL ，转移至样本处理区。

4.1.2.2 加样（样本处理区进行）：

在各设定的荧光 RT-PCR 管中分别加入上述样本处理步骤 4.1.1.7 中制备的 RNA 溶液各 10 μL ，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。（阳性对照不需要提取核酸，可以直接吹打混匀后吸取当模板）

4.1.2.3 荧光 RT-PCR 检测（在检测区进行）：

将 4.1.2.2 中离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

循环条件设置：

第一阶段，反转录 42 $^{\circ}\text{C}$ /30 min；

第二阶段，预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ /2 min；

第三阶段，94 $^{\circ}\text{C}$ /15sec，55 $^{\circ}\text{C}$ /10 sec，60 $^{\circ}\text{C}$ /30 sec 共 40 个循环。荧光收集在第三阶段每次循环的 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸时进行。

试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

4.2 结果判定

4.2.1 结果分析条件的设定 阈值设定原则：根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过阴性对照品扩增曲线的最高点为准。对于多通道荧光 PCR 仪，选定 FAM(465-510)检测通道读取检测结果，ABI 仪器选择 5' FAM；3' TAMRA 淬灭基团。

4.2.2 质控标准

- a) 阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线。
- b) 阳性对照的 Ct 值应小于等于 30，并出现典型的扩增曲线。
- c) 如阴性和阳性对照不满足以上条件，此次实验视为无效。

4.2.3 结果判定

- a) 阴性：无 Ct 值，且无特征性扩增曲线，表明样品为阴性。
- b) 阳性：Ct 值 \leq 40.0，且出现典型的扩增曲线，表示样品为阳性，含有马流感病毒核酸。

【注意事项】

1. 实验室应至少分三个区：样品处理区、反应混合物配制区和检测区。
2. 各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染。检测结束后，应立即对工作台进行清洁。
3. 分装反应液时，应尽量避免产生气泡。上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
4. 阳性对照在吸取前应在微量漩涡振荡器上剧烈振荡 1~2 秒。
5. 试剂盒中各组分应避免反复冻融。

【规格】 50 份/盒

【贮藏与有效期】 荧光 RT-PCR 检测试剂盒-20℃保存，有效期为 12 个月；《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》室温保存。

5、相关技术信息（OIE 推荐的引物和探针序列）

Forward: 5'-AGA-TGA-GYC-TTC-TAA-CCG-AGG-TCG-3'

Reverse: 5'-TGC-AAA-NAC-ATC-YTC-AAG-TCT-CTG-3'

Probe: 6-FAM-5'-TCA-GGC-CCC-CTC-AAA-GCC-GA-3'-TAMRA

N=A, G, C or T and Y=C or T