

禽流感病毒 H9 亚型荧光 RT-PCR 检测试剂盒说明书

Method of the real-time RT-PCR for the detection of Avian influenza Virus Subtype H9

(50 reactions)

1、试剂盒简介

货号：HB-101-4

禽流感病毒各亚型均属 A 型流感病毒，根据 H9 亚型流感病毒共有基因特定的序列，合成一对特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针。该探针与禽流感病毒 H9 亚型特有的共同基因特异性结合，结合部位位于引物结合区域内。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 BHQ1 修饰。本试剂盒是依据国标 GB/T19438.4-2004 《H9 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法》生产的配套标准试剂。

2、试剂盒组成

试剂盒组成包括核酸扩增试剂。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
核酸提取试剂：核酸裂解液 (根据客户要求选配)	15ml × 2 管
核酸扩增试剂：	
DEPC 水	1ml × 1 管
H9 禽流感荧光 RT-PCR 反应液	750 μL × 1 管
酶混合物	60 μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
H9 禽流感荧光阳性对照	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、咽喉拭子/泄殖腔拭子、血清或血浆、组织渗出液等）中禽流感病毒的 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）：

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。

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

- 4.1.1.2 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。

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，53 $^{\circ}\text{C}$ /10 sec，60 $^{\circ}\text{C}$ /35 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 FAM 无荧光淬灭基团。

4.2.2 质控标准

- a) 阴性对照无 Ct/Cp 值并且无扩增曲线。
- b) 阳性对照的 Ct/Cp 值应小于等于 28，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/Cp 值，且无特征性扩增曲线，表明样品为阴性。
- b) 阳性：Ct/Cp 值 \leq 30.0，且出现典型的扩增曲线，表示样品为阳性。
- c) Ct/Cp 值大于 30.0，且出现典型的扩增曲线的样品建议复验。复验仍出现上述结果的，判为阳性，否则判为阴性。

【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。