禽流感病毒 N6 亚型实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒使用说明书

用途 本试剂盒采用实时荧光 RT-PCR 方法检测禽组织、分泌物、排泄物及尿囊液中的禽流感病毒 N6 亚型（AIV-N6）的 RNA，适用于 AIV-N6 的检测、诊断和流行病学调查。

原理 利用离心柱内硅基质膜提取样品总 RNA，在高效反转录酶的作用下，以 RNA 为模板，以引物为起点合成与 RNA 模板互补的 cDNA 链。在热启动 Taq 酶的作用下，经高温变性、中温退火及延伸的循环，使特异 DNA 片段的拷贝数放大一倍，经荧光素标记的探针与扩增的 DNA 杂交，利用 Taq 聚合酶的 5'→3'外切活性，使荧光探针的报告基团与淬灭基团分离，发出特异性荧光信号，利用荧光 PCR 仪检测特异性荧光信号，根据样品 Ct 值的大小及扩增曲线的形成情况判定结果。

试剂盒组成

名称	50 头份	贮藏条件
裂解液	30 mL	室温（A 盒）
洗液	60 mL	
洗脱液	10 mL	
吸附柱和收集管	50 套	
阴性对照	**1 mL**	**-20 ℃（B 盒）**
阳性对照	**600 μL**	
无菌无核酸酶水	**600 μL**	
RT-PCR 反应液	**600 μL**	
酶混合液	**24 μL**	
荧光探针	**115 μL**	

保存期 本产品有效期为 12 个月。

需要自备的器材

1．仪器：分析天平、离心机、荧光 PCR 扩增仪、组织研磨器、-20 ℃冰箱、可调移液器（2 μL、20 μL、200 μL、1000 μL）。
2．耗材：荧光 PCR 专用反应管、眼科剪、眼科镊、生理盐水、1.5 mL 经焦碳酸二乙酯（DEPC）水处理的灭菌离心管、吸头（10 μL、200 μL、1000 μL）、灭菌双蒸水。

使用注意事项

1．所有接触病料的物品均应合理处置，以免污染实验室。
2．PCR 整个试验分配液区、模板提取区、扩增区。流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区。严禁器材和试剂倒流。
3．所有试剂应在规定的温度储存。-20℃保存的各试剂管使用前应完全融化，8000 rpm 离心 15 s，使液体全部沉于管底，放于冰盒中，吸取液体时移液器吸头尽量在液体表面层吸取，使用后立即放回-20 ℃。
4．在 RNA 提取过程中，避免 RNA 酶污染，尽量缩短操作时间。
5．注意防止试剂盒组分受污染。不要使用超过有效期限的试剂，试剂盒之间的成分不要混用。
6．严格遵守操作说明可以获得最好的结果。操作过程中移液、定时等全部过程必须精确。
7．反应体系应在特定配液区或者超净工作台中配制，整个实验过程严格控制污染。
8．反复冻融试剂将降低检测灵敏度，本试剂盒应在 3 次内用完，请严格按试剂盒说明书操作。

样品制备

1 样品采集：病死或扑杀禽，取喉气管、肌肉和肺等组织；待检活禽，用棉拭子取呼吸道分泌物或排泄物，置于 50%甘油生理盐水中。2～8 ℃保存，送实验室检测。（要求送检病料新鲜，严禁反复冻融。）

2 样品处理：每份样品分别处理。

2.1 组织样品处理：每份组织分别从三个不同的位置称取样品约 1g，用手术剪剪碎混匀后取 0.02 g 于研磨器中研磨，加入 1.5 mL 生理盐水继续研磨，待匀浆后转至 1.5 mL 灭菌离心管中，8000 rpm 离心 2 min，取上清液 100 μL 于 1.5 mL 灭菌离心管中。

2.2 阳性对照处理：取阳性对照 100 μL，置 1.5 mL 灭菌离心管中。

2.3 阴性对照处理：取阴性对照 100 μL，置 1.5 mL 灭菌离心管中。

操作步骤

1 病毒 RNA 的提取

1.1 取已处理的样品、阴性对照和阳性对照，分别加入裂解液 600 μL，充分颠倒混匀，室温静置 3～5 min。

1.2 将液体吸入吸附柱中（吸附柱要套上收集管，吸取液体时尽量不要吸到悬浮杂质，以免离心时堵塞吸附柱），13000 rpm 离心 30 s。

1.3 弃去收集管中液体，加入 600 μL 洗液，13000 rpm 离心 30 s。

1.4 重复步骤 1.3。

1.5 弃去收集管中液体，13000 rpm 空柱离心 2 min，以除去残留的洗涤液。

1.6 将吸附柱移入新的 1.5 mL 离心管中，向柱中央加入洗脱液 50 μL，室温静置 1 min，13000 rpm 离心 30 s，离心管中液体即为模板 RNA。

2 实时荧光 RT-PCR 操作

设被检样品、阴性对照和阳性对照总和为 N，则反应体系配制如下：

试剂	体系
无菌无核酸酶水	2.7（N+1）μL
RT-PCR 反应液	10（N+1）μL
酶混合液	0.4（N+1）μL
荧光探针	1.9（N+1）μL

将以上配制的反应体系充分混匀后，分装每个反应管中各 15 μL。

分别取 5 μL 模板 RNA，加入相应反应管中，混匀并作好标记，在荧光 PCR 仪上进行以下反应：45 ℃ 15 min，95 ℃ 1min；95 ℃ 5 s，60 ℃ 35 s，在每个循环第二步（60℃ 35s）收集荧光信号，共 40 个循环。（报告基团“FAM”，淬灭基团“None”）。

结果判定

1 结果分析条件设定

阈值设定原则：阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

2 结果描述及判定

阳性对照 Ct 值≤30 并出现特定的扩增曲线，阴性对照无 Ct 值并且无特定扩增曲线，实验结果成立；被检样品 Ct 值≤30 并出现特定的扩增曲线为 AIV-N6 阳性；被检样品 30＜Ct＜35 并出现特定的扩增曲线，需重新取样提取 RNA，扩增后进行结果判定，如仍是可疑，可判定为阳性；被检样品 Ct 值≥35 时，超过本方法检测灵敏度范围，判定为阴性；**对于某些未呈现 S 型曲线，但本底较高的样品，应为阴性。**