禽流感病毒 N9 亚型 RT-PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

禽流感病毒 N9 亚型（AIV-N9）反转录聚合酶链反应（RT－PCR）检测试剂盒，用于检测禽组织、分泌物、排泄物及尿囊液中的 AIV-N9，适用于 AIV-N9 的诊断、检测和流行病学调查。

【原理】

提取样品 RNA，在反转录酶的作用下，以 RNA 为模板，以引物为起点合成与 RNA 模板互补的 cDNA 链。在 TaqDNA 聚合酶的作用下，经高温变性、低温退火、中温延伸的循环，使特异 DNA 片段的拷贝数放大一倍。经过多次循环，最终使扩增 DNA 片段放大了数百万倍。将扩增 DNA 片段进行电泳，经染色后，在紫外灯照射下，肉眼可见到 DNA 片段的扩增带。

【试剂盒组成】

名称	10 头份	50 头份	贮藏条件
阴性对照	350 μL	1 mL	-20℃
阳性对照	350 μL	1 mL	
RT-PCR 反应液	200 μL	1 mL	
X 液	5 μL	10 μL	
酶混合液	15 μL	65 μL	
0.2 mL 薄壁 PCR 管	15 个	60 个	
说明书	1 份	1 份	

【需要自备的器材】

1. **试剂**：核酸提取试剂、琼脂糖、电泳试剂等。
2. **仪器**：分析天平、离心机、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪（或紫外分析仪）、微波炉、-20 ℃冰箱、可调移液器（2 μL、20 μL、200 μL、1000 μL）。
3. **耗材**：称量纸、20 mL 一次性注射器、500 mL 量筒、500 mL 锥形瓶、经焦碳酸二乙酯（DEPC）水处理的灭菌 1.5mL 离心管和吸头（10 μL、200 μL、1000 μL）、灭菌双蒸水。

【使用注意事项】

1. 建议与世纪元亨提供的柱式 RNA 核酸提取试剂盒（含电泳试剂）配套使用。
2. 实验过程中进行阴性对照和阳性对照样品的质量控制，需进行提取，建议提取用量分别为 100μL。
3. 所有接触病料的物品均应合理处置，以免污染实验室。
4. PCR 整个试验分配液区、模板提取区、扩增区、电泳区。流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区→电泳区。严禁器材和试剂倒流。
5. 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，8000rpm 离心 15s，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℃。
6. 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。
7. 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。
8. 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。
9. 反复冻融试剂将减低检测灵敏度，本试剂盒应在 3 次内用完。

【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。）

【RT-PCR 操作】

每份总体积 20 μL，含 16.8 μL RT-PCR 反应液（用前混匀），1.2 μL 酶混合液，2 μL 模板 RNA。

例如：n 份样品，配制 n+1 份，16.8×（n+1）RT-PCR 反应液，再加入 1.2×（n+1）酶混合液，混匀后取 18 μL 分装成 n 份，分别加入 2 μL 模板 RNA（**阳性对照管加入 1 μL 阳性对照 RNA 和 1 μL X 液**），PCR 扩增仪若无热盖则要在管中加矿物油覆盖，作好标记。

在 PCR 扩增仪上进行以下程序：42 ℃ 45 min，95 ℃ 3 min；循环 95 ℃ 30 s，52 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，共 35 次；再 72 ℃延伸 7min。

【电泳】

称 3 g 琼脂糖放于 500 mL 锥形瓶中，加入 50 倍稀释的 TAE 电泳缓冲液 200 mL（取 4 mL 50 倍 TAE 电泳缓冲液，用双蒸水稀释至 200 mL），于微波炉中溶解，再加入 10 μL 染色液混匀。在电泳槽内放好梳子，倒入琼脂糖凝胶，待凝固后将 PCR 扩增产物 10 μL，点样于琼脂糖凝胶孔中，以 110～120V 电压于 50 倍稀释的 TAE 电泳缓冲液中电泳，紫外灯下观察结果。

【结果判定】

阳性对照出现 377bp 扩增带、阴性对照无带出现（引物带除外）时，实验结果成立。被检样品出现 377bp 扩增带为禽流感病毒 N9 亚型阳性，否则为阴性。

【规格】10 头份/盒　50 头份/盒

【保存及有效期】0.2 mL 薄壁 PCR 管可存放于室温，其他试剂于-20℃以下保存，有效期为 6 个月。

【生产企业】哈尔滨元亨生物药业有限公司

【地址】哈尔滨利民开发区珠海路 1 号