

A 型流感病毒 RT-PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

A 型流感病毒反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测试剂盒,用于检测猪、禽等动物组织、分泌物和排泄物中 A 型流感病毒,适用于猪、禽等动物流感病毒的检测、诊断和流行病学调查。

【原理】

针对 A 型流感病毒 NP 基因,设计特异性引物,进行反转录聚合酶链反应,以检测各种动物样品中的 A 型流感病毒。

【试剂盒组成】

名称	10 头份	50 头份	贮藏条件
阴性对照	350 μ L	1 mL	-20 $^{\circ}$ C
阳性对照	350 μ L	1 mL	
RT-PCR 反应液	200 μ L	1 mL	
X 液	5 μ L	10 μ L	
酶混合液	15 μ L	65 μ L	
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】

- 试剂:** 核酸提取试剂、琼脂糖、电泳试剂等。
- 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 $^{\circ}$ C 冰箱、可调移液器(2 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L)。
- 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 μ L、200 μ L、1000 μ L)、灭菌双蒸水。

【使用注意事项】

- 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。
- 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 100 μ L。
- 所有接触病料的物品均应合理处置,以免污染实验室。
- 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 \rightarrow 模板提取区 \rightarrow 扩增区 \rightarrow 电泳区。严禁器材和试剂倒流。
- 所有试剂应在规定的温度储存。-20 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C。
- 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。
- 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。

- 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。
- 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】

病死或扑杀猪、禽等,取喉气管、脑、胸肌、心肌和肺等组织;待检活猪、禽等,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 $^{\circ}$ C 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 μ L,含 16.8 μ L RT-PCR 反应液(用前混匀),1.2 μ L 酶混合液,2 μ L 模板 RNA。

例如: n 份样品,配制 n+1 份,16.8 \times (n+1) RT-PCR 反应液,再加入 1.2 \times (n+1) 酶混合液,混匀后取 18 μ L 分装成 n 份,分别加入 2 μ L 模板 RNA(阳性对照管加入 1 μ L 阳性对照 RNA 和 1 μ L 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 $^{\circ}$ C 45 min, 95 $^{\circ}$ C 3 min; 循环 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 次;再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

【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 μ L 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 μ L 混合 2 μ L 上样缓冲液,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 330 bp 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 330 bp 扩增带为 A 型流感病毒阳性,否则为阴性。

【亚型鉴定】

阳性样品分别采用 H1、H3、H5 及 H9 等亚型 RT-PCR 试剂进行进一步的检测,必要时进行基因序列测定,以确定流感病毒的亚型。

【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 $^{\circ}$ C 以下保存,有效期为 12 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