

高致病性 H7N9 亚型流感病毒 RT-PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

高致病性 H7N9 亚型流感病毒反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测试剂盒, 动物组织、泄殖腔拭子 (禽类) 或鼻拭子 (猪)、环境样品高致病性 H7N9 流感病毒 (HP-H7N9) 的 RNA, 适用于 HP-H7N9 的检测、诊断和流行病学调查。

【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 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】

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 $^{\circ}$ C 冰箱、可调移液器 (2 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L)。
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 μ L、200 μ L、1000 μ L)、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 100 μ L。
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 $\rightarrow$ 模板提取区 $\rightarrow$ 扩增区 $\rightarrow$ 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 $^{\circ}$ 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。

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】

病死或扑杀动物, 取喉气管、脑、胸肌、心肌和肺等组织; 待检活动物, 用棉拭子取咽喉拭子、泄殖腔拭子、鼻拭子等, 置于 50% 甘油生理盐水中 (拭子留在管中)。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 扩增带为禽流感病毒阳性, 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 $^{\circ}$ 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