

禽流感病毒 N9 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 N9 亚型 (AIV-N9) 的 RNA, 适用于 AIV-N9 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】

组成	50 头份	贮藏条件
阴性对照	1 mL	-20℃
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	130 μL	
说明书	1 份	

【需要自备的器材】

1. **试剂:** 核酸提取试剂。
2. **仪器:** 离心机、荧光 PCR 扩增仪、-20℃冰箱、可调移液器 (2μL、20μL、200μL、1000μL)。
3. **耗材:** 荧光 PCR 专用反应管、吸头 (10μL、200μL、1000μL)。

【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。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。
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。)

【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	2.4 × (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	2.2 × (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 15μL。分别取 5μL 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℃ 15min, 95℃ 1min; 95℃ 5s, 60℃ 35s, 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 并出现特异性扩增曲线, 阴性对照无 Ct 值并且无特异性扩增曲线, 实验结果成立; 被检样品 Ct 值 ≤ 30 并出现特异性扩增曲线为 AIV-N9 阳性; 被检样品 30 < Ct < 37 并出现特异性扩增曲线, 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 ≥ 37 时, 超过本方法检测灵敏度范围, 判定为阴性; 对于某些未呈现特异性扩增曲线, 但本底较高的样品, 应判定为阴性。

【规格】50 头份/盒

【保存及有效期】于-20℃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