



## 甲型流感病毒 N6 探针法 qRT-PCR 试剂盒

Influenza Virus A N6 Probe qRT-PCR Kit

货号: JLC\_Y7745

使

用

说

明

书

| 产品及特点                                                                    | <p>甲型流感病毒 N6（Influenza Virus A N6），又称为禽流感病毒 N6，是神经氨酸酶（Neuraminidase）第 6 型的病毒，属正粘病毒科甲型流感病毒属。甲型流感病毒 N6 颗粒呈多形性，其中球形直径 80~120 nm，有囊膜。基因组为分节段单股负链 RNA，全长约 13.6 nt。该病毒基因变异后能够感染人类，感染后的症状主要表现为高热、咳嗽、流涕、肌痛等，多数伴有严重的肺炎，严重者心、肾等多种脏器衰竭导致死亡，病死率很高，严重威胁着人类的生命健康。因此快速检测甲型流感病毒 N6 具有重要的意义。为此，本公司以探针法 qRT-PCR 技术为基础开发了甲型流感病毒 N6 的检测试剂盒，<b>它具有下列特点：</b></p> <p>1. 即开即用，用户只需要提供样品 RNA 模板。</p> <p>2. 引物和探针经过优化，分析灵敏度高，可以达到 100 拷贝/反应。</p> <p>3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。</p> <p>4. 特异性高，引物是根据甲型流感病毒 N6 RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。</p> <p>5. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。定量检测时线性范围至少 5 个数量级。</p> <p>6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。</p> <p>7. 本产品只能用于科研。</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |           |    |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                          |      |           |                                   |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                          |  |  |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----------|----|----|----|-----------------|-------|-----------|---------------------|------|-----------|----------------|-----|-----------|--------------------------|------|-----------|-----------------------------------|------|-----------|------|-----|---|------------|--|--|--------------------------------------------------------------------------|--|--|
|                                                                          | 规格及成分                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <table><tr><th>成分</th><th>规格</th><th>包装</th></tr><tr><td>探针法 qRT-PCR 缓冲液</td><td>500μL</td><td>0.5mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2</td><td>50μL</td><td>0.5mL 红盖管</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>1mL</td><td>1.5mL 绿盖管</td></tr><tr><td>甲型流感病毒 N6qRT-PCR 引物-探针干粉</td><td>50 次</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr><tr><td>甲型流感病毒 N6 qRT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)</td><td>50μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>1 份</td><td>无</td></tr><tr><td colspan="3">本产品采用五孔盒包装</td></tr><tr><td colspan="3"><b>注 意：</b>引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。</td></tr></table> |       |           | 成分 | 规格 | 包装 | 探针法 qRT-PCR 缓冲液 | 500μL | 0.5mL 蓝盖管 | 探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2 | 50μL | 0.5mL 红盖管 | 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 1mL | 1.5mL 绿盖管 | 甲型流感病毒 N6qRT-PCR 引物-探针干粉 | 50 次 | 0.5mL 棕色管 | 甲型流感病毒 N6 qRT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL) | 50μL | 0.5mL 黄盖管 | 使用手册 | 1 份 | 无 | 本产品采用五孔盒包装 |  |  | <b>注 意：</b> 引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。 |  |  |
|                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 成分                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 规格    | 包装        |    |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                          |      |           |                                   |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                          |  |  |
|                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 探针法 qRT-PCR 缓冲液                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 500μL | 0.5mL 蓝盖管 |    |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                          |      |           |                                   |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                          |  |  |
|                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 50μL  | 0.5mL 红盖管 |    |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                          |      |           |                                   |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                          |  |  |
|                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 荧光 PCR 专用模板稀释液                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1mL   | 1.5mL 绿盖管 |    |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                          |      |           |                                   |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                          |  |  |
|                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 甲型流感病毒 N6qRT-PCR 引物-探针干粉                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 50 次  | 0.5mL 棕色管 |    |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                          |      |           |                                   |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                          |  |  |
|                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 甲型流感病毒 N6 qRT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 50μL  | 0.5mL 黄盖管 |    |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                          |      |           |                                   |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                          |  |  |
| 使用手册                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1 份                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 无     |           |    |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                          |      |           |                                   |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                          |  |  |
| 本产品采用五孔盒包装                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |           |    |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                          |      |           |                                   |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                          |  |  |
| <b>注 意：</b> 引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |           |    |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                          |      |           |                                   |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                          |  |  |
| 使用方法                                                                     | <p><b>一、一、稀释标准曲线样品</b>（以 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例）。由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分）。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |           |    |    |    |                 |       |           |                     |      |           |                |     |           |                          |      |           |                                   |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                          |  |  |

为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供无传染性的 DNA 片段作为阳性对照。如果需要 RNA 阳性样品，需要另外订购。

1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。
2. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu\text{L}$  荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头，下同）。
3. 在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E7 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E6 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E5 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E5 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E4 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

## **二、样品 RNA 的制备**

7. 如果有 N 个样品，设置 N+2 个提取，多出的一个是 PC (样品制备阳性对照)，一个是 NC (样品制备阴性对照)。可以用 10  $\mu\text{L}$  上步所得第 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次样本制备所要求的起始样本体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。
8. 用自选方法纯化样品的 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容，也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

## **三、Probe qRT-PCR 反应 (20 $\mu\text{L}$ 体系，在样品制备室进行)**

9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 个 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照 (用水做模板)，6 个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复，则标记 N+4 个 RT-PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照 (用水做模板)，1 个用于 RT-PCR 阳性对照 (直接用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板)。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
10. 在标记管中按下表加入各成分 (本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳

性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后加)：

| 成分                         | 样品管<br>N+2 个 | RT-PCR<br>阴性对照 | 标准曲线样品管<br>(1-6 管) |
|----------------------------|--------------|----------------|--------------------|
| 探针法 qRT-PCR 缓冲液            | 各 10μL       | 10μL           | 各 10μL             |
| 探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2        | 各 1μL        | 1μL            | 各 1μL              |
| 甲型流感病毒 N6 qRT-PCR 引物-探针混合液 | 各 3μL        | 3μL            | 各 3μL              |
| N+2 个待测 RNA 样本             | 各 6μL        | 不加             | 不加                 |
| 超纯水                        | 不加           | 6μL            | 不加                 |
| 第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)   | 不加           | 不加             | 各 6μL              |

11 盖上盖子后上机，按下面参数进行 qRT-PCR：

| 过程                 | 温度  | 时间                               |
|--------------------|-----|----------------------------------|
| 逆转录                | 50℃ | 10min                            |
| 预变性                | 95℃ | 10min                            |
| PCR 反应<br>(40 个循环) | 95℃ | 15sec                            |
|                    | 60℃ | 60 sec(采集 FAM 通道的荧光信号,淬灭基团为 NFQ) |

四、数据处理

12. 如果样本制备阳性对照或 RT-PCR 阳性对照(包括标曲样本)结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据，需要重新样本制备，重新进行 RT-PCR 扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或 RT-PCR 阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系。

13. 如果阴性对照和阳性对照均正常，则实验有效，可以进入后续分析。

14. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标

|              |                                                                                                                                                                                                                |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              | <p>准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。</p> <p><b>15.</b> 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照 Ct 必须没有读数，或者大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于 40。对待测样品，如果其 Ct 没有读数、大于或等于 40 则均为阴性，如果小于 40 则为阳性。</p> |
| <b>自备试剂</b>  | 样品 RNA，超纯水，核酸纯化试剂盒。                                                                                                                                                                                            |
| <b>运输及保存</b> | 低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。                                                                                                                                                                                           |

**生产企业：上海机纯实业有限公司**

**公司地址：上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603**

**公司电话：021-54720761**

**技术支持：13166274223**