



猪流感病毒 H1N1 型(SIV-H1N1)核酸扩增检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

【名称】

中文名: 猪流感病毒 H1N1 型(SIV-H1N1)核酸扩增检测试剂盒

英文名: Swine Influenza Virus Fluorescence Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) Diagnostic Kit

汉语拼音: zhu liu gan bing du H1N1 xing he suan kuo zeng jian ce shi ji he

【目的】

本试剂盒适用于检测疑似患者咽拭子标本、血清及病死动物肺脏等组织标本中猪流感病毒H1N1型(PIV-H1N1)mRNA, 适用于猪流感病毒H1N1型(PIV-H1N1)感染引起的猪流感辅助诊断。其检测结果仅供参考。

【原理】

本试剂盒用Trizol提取猪流感病毒H1N1 型(PIV-H1N1)RNA, 经过逆转录作用生成cDNA, 用一对猪流感病毒H1N1 型(PIV-H1N1)特异性引物结合一条特异性荧光探针, 配以FQ-Buffer(内含Mg²⁺、Tris-HCl等)、耐热DNA聚合酶(Taq酶)、四种核苷酸单体(dNTPs)等成分, 通过一步PCR-荧光探针体外扩增法对猪流感病毒H1N1 型(PIV-H1N1)RNA进行扩增, 从而达到快速实时定量检测之目的。

【组成】

名 称	数 量	规 格
PIV-H1N1 PCR MIX	1 管	800μl/管
Taq 酶系	1 管	40μl/管
逆转录酶系	1 管	40μl/管
PIV 阳性质控品	1 管	100μl/管
阴性质控品	1 管	250μl/管
DEPC 水	1 管	2000μl/管

备注: 病毒浓缩液、Trizol 等另行配备

【标本采集】

1. 适用标本类型: 疑似病人粪便、咽拭子标本、疱疹液、脑脊液或病毒分离培养物标本等。

2. 标本采集:

咽拭子标本: 采集病人发病 3 日内的咽拭子标本, 用专用采样棉签, 适度用力拭抹咽后壁和两侧扁桃体部位, 应避免触及舌部; 迅速将棉签放入装有 1~2ml 保存液(维持液或生理盐水)的采样管中, 在靠近顶端处折断棉签杆, 旋紧管盖并密闭送检。

血清: 无菌条件下取疑似病人外周静脉血 3ml, 转至 5ml 干燥管中, 室温静置 30min, 3000g 离心 5min, 取 1ml 血清转至 1.5ml 洁净的离心管中, 密闭送检。

【保存和运输】 上述标本短期内可保存于-20℃, 长期保存可置-70℃, 但不能超过 6 个月, 标本运送应采用 0℃冰壶, 采集标本应立即(12h 内)送达实验室。

【适用仪器】 主要包括 ABI GeneAmp PCR System7700、ABI GeneAmp PCR System7500, ABI PRISM 7300, LightCycler 等, LightCycler 等毛细管的仪器, MJ Opticon 系列或取得资格认证的定量 PCR 仪。

【使用方法】

1. RNA 提取

1.1 样品处理:

咽拭子: 取 500μl 样品液加入 500μl **病毒浓缩液**充分震荡, 4℃冷冻离心机 13,000rpm 离心 10min,去上清, 保留 50μl 左右的样品液体,加入 500 μlTrizol reagents (RNA 提取液)充分震荡, 室温放置 5min。

血清或血浆: 取 500μl 血清加入 500μl **病毒浓缩液**充分震荡, 4℃冷冻离心机 13,000rpm 离心 10min,去上清, 保留 50μl 左右的样品液体,加入 500 ul Trizol reagents (RNA 提取液)充分震荡, 室温放置 5min。

肺脏等组织: 取 50mg 左右组织用玻璃匀浆器匀浆或剪刀剪碎, 加入 500μl Trizol reagents (RNA 提取液), 研磨或振荡, 转移到 1.5mL 的 EP 管中, 室温放置 5min 后。

- 1.2.加入 100ul 氯仿, 用力震荡 15s, 室温静置 5min, 4℃ 13,000rpm 离心 10min。
- 1.3.小心将上层水相转移到干净离心管中, 加等体积异丙醇, 充分混匀, 13,000rpm 离心 10min。
- 1.4.弃上清, 加入 500 μl 75%的 DEPC 乙醇, 充分混匀, 13,000rpm 离心 10min, 小心吸去大部分乙醇。
- 1.5.将提取管敞口在室温空气中干燥 5min待乙醇挥发干净, 用 20μl DEPC H₂O溶解沉淀。

阴性质控品: 取 50μl 阴性质控品加入 150 μl Trizol reagents (RNA 提取液) 充分震荡, 室温放置 10min。后按 1.2~1.5 操作。

PIV 阳性质控品: 直接取 3μl 进行 PCR 扩增。

2. PCR 扩增

从试剂盒中取出 **PIV-PCR MIX**、**Taq 酶系**、**逆转录酶系**, 室温融化并振荡混匀后, 10,000rpm 离心 10s。

设所需要的 PCR 反应管数为 N (N=样本数+1 管阴性对照+1 管阳性对照), 每个测试反应体系配制如下表:

试剂	PIV-PCR MIX	Taq 酶系	逆转录酶系
用量	20μl	1μl	1μl

计算好各试剂的使用量, 加入一适当体积洁净 0.2ml 离心管中, 充分混匀, 10,000rpm 离心 10s, 向设定的 N 个 PCR 反应管中分别加入 22μl, 向每管中加入处理后样品(提取 RNA)或 **PIV-阳性质控品**和**阴性质控品** 3μl, 10,000rpm 瞬时离心 10 秒。将各反应管放入定量 PCR 仪器的反应槽内, 按对应顺序设置**阴性质控品**, **阳性质控品**以及未知标本, 并设置样品名称、标记荧光基团种类(报告基团 FAM、猝灭基团 TAMRA)和循环条件:

ABI PRISM 7700, ABI PRISM5700,ABI GeneAmp 7000 (需要剪掉反应盖), ABI PRISM7300/7500(使用 8 联管), MJ Opticon(使用 8 联管)等使用薄壁管的仪器:循环条件: 42℃→20 分钟, 后 93℃→2 分钟, 后 93℃ 30 秒→55℃ 45 秒, 40 个循环。

LightCycler 等使用毛细管的仪器: 循环条件: 42℃→20 分钟, 93℃→2 分钟, 后 93℃ 5 秒→58℃ 45 秒, 共 40 个循环。

3. 结果分析判定

反应结束后, 使用手动调整阈值使**阴性质控品 Ct 值在 40 以上**, Ct 值小于 35 个循环的为阳性; Ct 值在 35-40 个循环之间, 为灰区, 需要进行重复试验。重复试验之后, 如果 Ct 值仍然在 35-40 个循环之间, 判断为阳性, 没有荧光值增长为阴性。

【质控标准】

阴性质控品: 全部阴性。

PIV-阳性质控品: **阳性质控品**的 Ct 值均应小于 30, 且呈标准 S 型扩增曲线。

以上条件应同时满足, 否则, 此次试验视为无效, 全部试验应重新进行。

【注意事项】

初次使用前请仔细阅读说明书。并严格按照说明书操作进行。

所有使用的离心管应高压灭菌(推荐使用, 而且必须不含 RNA 酶)。

PCR 操作应严格按照要求分区(试剂配制区、标本处理区、PCR 扩增区等), 防止实验室污染。

试剂盒里不同组分不能混用。每盒试剂请于 3 次内使用完毕。

所有试剂及待检标本应看作是传染物质。

【规格、贮藏及有效期】 40 份/盒。仅供科研。试剂盒应-20℃闭光保存, 避免反复冻融。有效期 10 个月。

【生产企业】

公司名称: 北京索奥生物技术有限公司

公司地址: 北京市西四环南路 56 号望园大厦 11 楼

邮政编码: 100073 电话: 010-51210252 传真: 010-51210270

免费电话: 800-706-0910

生产地址: 中关村科技园丰开望园科技孵化中心

公司网址: <http://www.suoabio.com>

电子邮箱: Order@suoabio.com