

TaKaRa Code: D330

---

**Cycleave RT-PCR Influenza A  
(H1N1-2009) Virus Detection Kit  
(25  $\mu$ l $\times$ 60 次量, NP、NA、HA 检测  
各 20 次量)**

---

说明书

**TaKaRa**

宝生物工程(大连)有限公司

# 目 录

内 容	页 码
●制品说明	1
●制品内容	1
●适用的 Real Time PCR 扩增仪	1
●探针标记	2
●扩增片段大小	2
●保 存	2
●原 理	2
●RNA 样品制备	3
●注意事项	3
●实验操作	4
●结果判定	8

## ● 制品说明

2009年4月25日,世界卫生组织首次向全球发出甲型H1N1流感疫情的通报,截至5月末,疫情迅速在墨西哥、美国、加拿大等近50个国家蔓延,确诊病例逾万人,死亡病例近百人,引起了人类的高度重视。2009年新型H1N1流感病毒属A型(甲型)流行性感冒病毒,含3种病毒的核酸序列,这3种病毒分别是猪流感病毒、禽流感病毒、人类甲型流感病毒。

本制品是采用Cycling Probe法快速特异性检出2009年甲型H1N1流感病毒的Real Time RT-PCR试剂盒。针对甲型流感病毒具有变异性强的特点,分别在2009年甲型H1N1流感病毒的NP基因、NA基因和HA基因上设计特异性检测的Cycling Probe,以防止病毒突变而导致的假阴性结果。本试剂盒使用具有较强延伸能力的PrimeScript RTase将病毒RNA反转录为cDNA,然后使用Hot Start DNA聚合酶*TaKaRa Ex Taq HS*扩增cDNA,此步骤与Cycling Probe法相结合,灵敏度高、特异性好,可以对2009年甲型H1N1流感病毒NP基因、NA基因和HA基因进行简单快速的实时检测。制品中病毒检测用的Cycling Probe使用了FAM标记,内参照使用了ROX标记,可以进行两色荧光的双通道同步检测。对内参照反应的检测,可以用以监控反应是否正常进行,防止假阴性结果的发生。

制品中的DNA聚合酶使用了Hot Start法用DNA聚合酶*TaKaRa Ex Taq HS*,可以有效抑制非特异性的PCR扩增,大大提高了PCR的检测灵敏度。使用本试剂盒中的Positive Control RNA制作标准曲线,可以对低至10 Copies的病毒进行定量分析。

## ● 制品内容 (25 $\mu$ l $\times$ 60 次量,其中NP $\times$ 20 次量,NA $\times$ 20 次量,HA $\times$ 20 次量)

1. 5 $\times$ PrimeScript Buffer (for Real Time) *1	120 $\mu$ l
2. PrimeScript RT Enzyme Mix III*2	30 $\mu$ l
3. H1N1-2009-NP R Primer (10 $\mu$ M)	20 $\mu$ l
4. H1N1-2009-NA R Primer (10 $\mu$ M)	20 $\mu$ l
5. H1N1-2009-HA R Primer (10 $\mu$ M)	20 $\mu$ l
6. 2 $\times$ CycleavePCR Reaction Mix*3	750 $\mu$ l
7. H1N1-2009-NP Primer/Probe Mix (FAM, ROX) (25 $\times$ ) *4	20 $\mu$ l
8. H1N1-2009-NA Primer/Probe Mix (FAM, ROX) (25 $\times$ ) *4	20 $\mu$ l
9. H1N1-2009-HA Primer/Probe Mix (FAM, ROX) (25 $\times$ ) *4	20 $\mu$ l
10. RNase Free dH <sub>2</sub> O	1 ml
11. Easy Dilution Buffer (for Real Time PCR) *5	1 ml
12. Control RNA for H1N1-2009-NP (5 $\times$ 10 <sup>7</sup> Copies/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
13. Control RNA for H1N1-2009-NA (5 $\times$ 10 <sup>7</sup> Copies/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
14. Control RNA for H1N1-2009-HA (5 $\times$ 10 <sup>7</sup> Copies/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l

\*1 内含 dNTP Mixture 等。

\*2 内含 RTase、Inhibitor。

\*3 内含 *TaKaRa Ex Taq HS*, Buffer, Tli RNase H, dNTP Mixture和Mg<sup>2+</sup>等。

\*4 内含内参照用模板、引物及探针,以及检测病毒用的引物和探针,应避光保存。

\*5 是制作标准曲线时梯度稀释 DNA 或 RNA 标准品的稀释液。模板 DNA 或模板 RNA 如果用水或 TE 稀释,受 Microtube 吸附作用的影响,往往不能准确稀释,导致实验结果精度降低。使用本制品,即使稀释至低浓度也能够进行准确稀释,容易在宽广范围内获得准确定量的标准曲线。EASY Dilution (TaKaRa Code: D9160) 也可以单独购买。

## ● 适用的 Real Time PCR 扩增仪

Thermal Cycler Dice® Real Time System (TaKaRa)

ABI PRISM7000/7700/7900HT, 7300/7500 Real-Time PCR System, 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

LightCycler (Roche Diagnostics)

Smart Cycler® System (Cepheid)

Mx3000P (Stratagene)

其他各种多通道检出 Real Time PCR 扩增仪

● 探针标记

Target	Reporter	Quencher
NP	FAM	Eclipse
NA	FAM	Eclipse
HA	FAM	Eclipse
Internal Control	ROX	Eclipse

● 扩增片段大小

NP、NA、HA RNA 及 Internal Control 扩增片段大小区别。

Target	NP	NA	HA	Internal Control
Size	156 bp	218 bp	265 bp	397 bp

● 保存: -20℃。

● 原理

本试剂盒使用PrimeScript® RTase将RNA反转录成cDNA，再以cDNA为模板由TaKaRa Ex Taq™ HS进行扩增反应，并采用Cycling Probe法对扩增产物进行实时监测。

1. PCR (Polymerase Chain Reaction; 聚合酶链式反应) 是一种体外扩增DNA的简单而有效的方法。虽然原理上PCR法是扩增DNA，RNA不能被扩增，但是经过反转录酶的作用把RNA反转录成cDNA后，PCR法便可应用于RNA的解析了。

本制品是2 Step RT-PCR，其原理如图1所示。

首先以Total RNA为模板，使用Specific Primer (Reverse) 进行反转录反应，合成cDNA。再以合成的cDNA为模板，使用Specific Primer (Forward, Reverse) 进行PCR扩增。(本试剂在反转录时不能使用Random Primer，详细说明请参照“注意事项”中的介绍)。

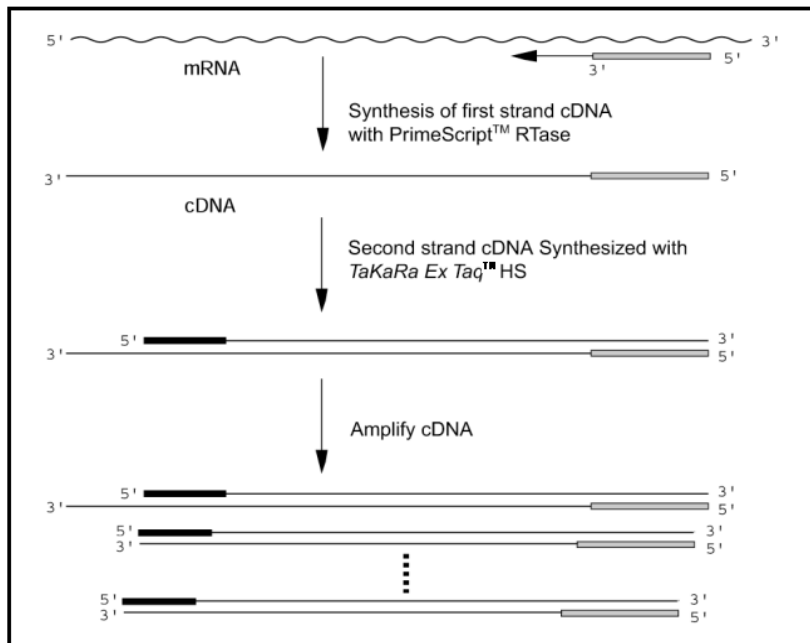


图1 2 Step RT-PCR原理图

## 2. Cycling Probe法。

Cycling Probe法是由RNA和DNA构成的杂合探针与RNase H组合使用的高灵敏度检出法，能够高效率地检出扩增过程中及扩增结束时的目的基因片段，具体原理如图2所示：

Cycling Probe内部含有RNA碱基、一端标记淬灭物质、另一端标记荧光物质，当探针处于完整状态时，由于荧光淬灭作用抑制荧光物质发出荧光。当探针与扩增产物中互补序列杂交后，RNase H在RNA碱基处切断探针，淬灭抑制作用解除，荧光物质发出荧光。此时通过测定荧光强度，能够实时监控扩增产物量。如果探针的RNA部位或与RNA部位临近的1~3个碱基中有一个碱基与模板不匹配，RNase H将不能切断探针，所以该检出方法是一种即使有一个碱基不同也能识别的高特异性检出方法。

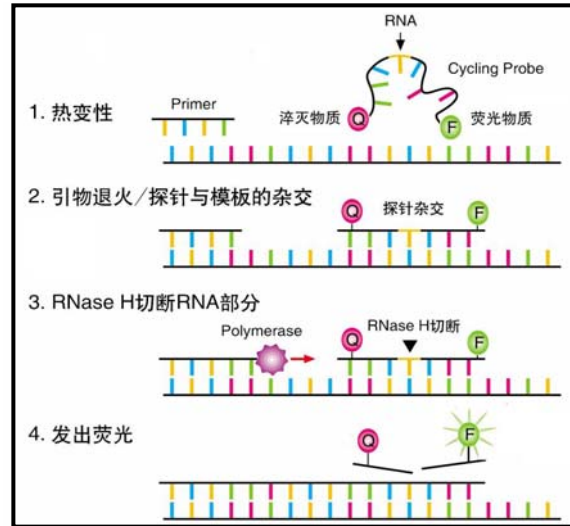


图 2 Cycling Probe 法原理图

### ● RNA 样品制备

本试剂盒是把 RNA 合成 cDNA，然后再对此 cDNA 进行扩增的试剂盒。RNA 的纯度会影响 cDNA 的合成量，而制备 RNA 的关键是要抑制细胞中的 RNA 分解酶和防止所用器具及试剂中的 RNA 分解酶的污染。因此，在实验中必须采取以下措施：戴一次性干净手套；使用 RNA 操作专用实验台；在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的 RNA 分解酶的污染。

#### 【使用器具】

尽量使用一次性塑料器皿，若用玻璃器皿，应在使用前按下列方法进行处理。

用 0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在 37℃ 下处理 12 小时。

然后在 120℃ 下高压灭菌 30 分钟以除去残留的 DEPC。

RNA 实验用的器具和仪器建议专门使用，不要用于其它实验。

#### 【试剂配制】

用于 RNA 实验的试剂，须使用干热灭菌（180℃，60 min）或用上述方法进行 DEPC 水处理灭菌后的玻璃容器盛装（也可使用 RNA 实验用的一次性塑料容器），使用的无菌水须用 0.1% 的 DEPC 处理后进行高温高压灭菌。

RNA 实验用的试剂和无菌水都应专用，避免混用后交叉污染。

#### 【制备方法】

Influenza A (H1N1-2009) 病毒为感染性及危害性很大的 RNA 病毒，其 RNA 制备需要在极其严格的环境条件下进行。进行 Influenza A (H1N1-2009) 病毒 RNA 样品制备时，我们推荐使用本公司的病毒 RNA/DNA 快速纯化试剂盒 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.3.0 (TaKaRa Code: DV818A)。

### ● 注意事项

1. Influenza A (H1N1-2009) 病毒具有高度传染性，样品的采集、处理、保存、运输、检测实验均应遵循国家相应的管理规定和生物安全条例。必须做好相关的保护措施，以确保实验人员安全。
2. 本试剂盒检测灵敏度高，为了防止污染，实验要分区操作。
  - ① 第一区：反应液配制区。
  - ② 第二区：样品制备区。
  - ③ 第三区：样品添加区及反应检测区。三个区间必须进行物理性隔离，避免人为因素造成污染。
3. 本试剂盒所使用的 Positive Control RNA 是通过人工合成 DNA 后，再经体外转录得到的。使用安全，无感染性。
4. 为了防止 Control RNA 分解，应尽量避免反复冻融，若条件允许，请尽量于 -70℃ ~ -80℃ 保存。

5. 荧光标记探针应避免保存。
6. 当同时需要进行数次 Real Time RT-PCR 反应时, 应先配制各种试剂的混合液, 然后再分装到每个反应管中。这样, 可使所取的试剂体积更准确, 减少试剂损失, 避免重复分取同一试剂。同时也可以减少实验操作或实验样品之间产生的误差。
7. 使用 PrimeScript RT Enzyme Mix III、2×CycleavePCR Reaction Mix 时, 应轻轻混匀, 避免起泡; 分取之前要小心地离心收集到反应管底部; 由于酶保存液中含有 50%的甘油, 粘度高, 分取时应慢慢吸取。
8. 配制 PCR 反应液时应避免强光照射。
9. 反应液的配制、分装请一定使用新的(无污染的)枪头、Microtube 等, 尽量避免污染。
10. 本试剂在反转录时不能使用 Random Primer, 因为 Random Primer 能和 Cycling 探针互补, Cycling 探针将被切断。

## ● 实验操作

1. 按下列组份配制 RT 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

5×PrimeScript Buffer (for Real Time PCR)	2 μl
PrimeScript RT Enzyme Mix III	0.5 μl
R Primer	1 μl
样品 RNA*	1 μl
RNase Free dH <sub>2</sub> O	5.5 μl
<b>Total</b>	<b>10 μl</b>

\* Negative Control 反应时, 用 RNase Free dH<sub>2</sub>O 替代样品 RNA。

Positive Control 反应时, 用 Control RNA 替代样品 RNA。

标准曲线制作时, 使用 Easy Dilution 将 Control RNA 梯度稀释, 并用各梯度稀释液替代样品 RNA。

按下列条件进行 RT 反应:

50°C 30 min

95°C 2 min

2. 按下列组份配制 PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

2×CycleavePCR Reaction Mix	12.5 μl
Primer/Probe Mix	1 μl
上述 RT 反应液	2 μl
dH <sub>2</sub> O	9.5 μl
<b>Total</b>	<b>25 μl</b>

按下列条件进行 Real Time PCR 反应:

95°C 30 sec

95°C 5 sec

55°C 10 sec

72°C 20~34 sec\*

} 45 Cycles

\* 使用仪器不同, 设定时间不同。

使用 Applied Biosystems 公司 Real Time PCR 扩增仪时必须根据仪器型号设定不同时间。

7700/7900HT 设定为 30 秒, 7000/7300 设定为 31 秒, 7500 设定为 34 秒, 7500 Fast 设定为 25 秒。其它仪器设定时间根据仪器使用说明在 20~30 sec 范围内进行调整。

3. 结果。

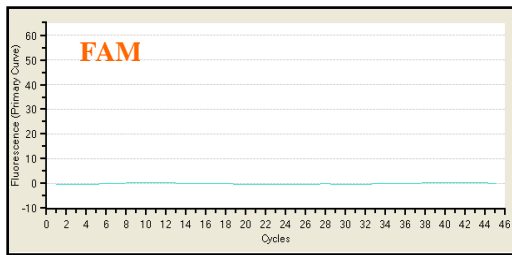
以 Control 反应为例, Negative Control 反应时, 用 RNase Free dH<sub>2</sub>O 替代样品 RNA; Positive Control 反应时, 将试剂盒附带的 Control RNA 使用 EASY Dilution (TaKaRa Code: D9160) 按 10 倍梯度稀释成 50~5×10<sup>7</sup> Copies/μl, 分别取 1 μl 为模板进行反应, 制作标准曲线。

定量 PCR 仪为 Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa Code: TP800)。

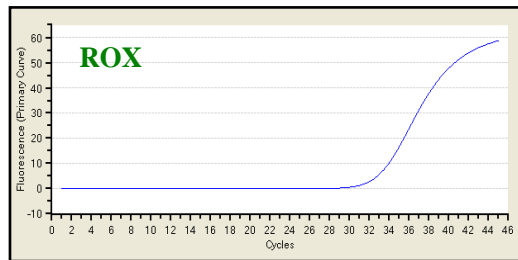
## A. H1N1-2009-NP

### 【Negative Control】

Well	Sample Name	Sample Type	Filter	Ct(SDM)
D10	H1N1-2009-NP-H2O	NTC	FAM	—
D10	H1N1-2009-NP-H2O	NTC	ROX	33.48



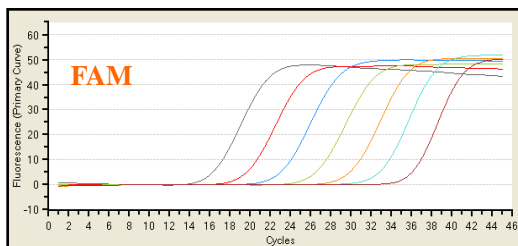
**FAM 通道扩增曲线图**  
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)



**ROX 通道扩增曲线图**  
(Y 轴: ROX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

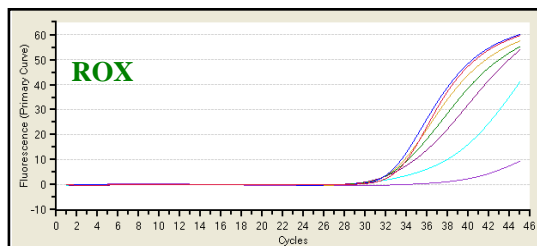
### 【Standard Curve】

Well	Sample Name	Sample Type	Filter	Ct(SDM)
D9	H1N1-2009-NP-1E1	STD	FAM	36.28
D8	H1N1-2009-NP-1E2	STD	FAM	33.30
D7	H1N1-2009-NP-1E3	STD	FAM	30.40
D6	H1N1-2009-NP-1E4	STD	FAM	26.84
D5	H1N1-2009-NP-1E5	STD	FAM	23.41
D4	H1N1-2009-NP-1E6	STD	FAM	20.00
D3	H1N1-2009-NP-1E7	STD	FAM	16.56

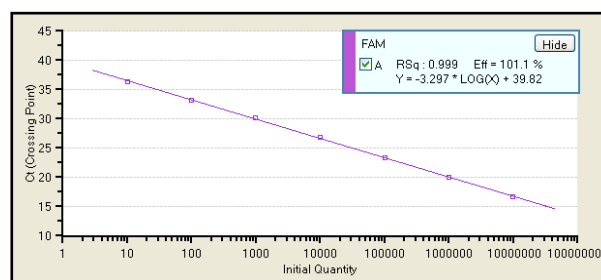


**FAM 通道扩增曲线图**  
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

Well	Sample Name	Sample Type	Filter	Ct(SDM)
D9	H1N1-2009-NP-1E1	STD	ROX	33.25
D8	H1N1-2009-NP-1E2	STD	ROX	32.47
D7	H1N1-2009-NP-1E3	STD	ROX	32.76
D6	H1N1-2009-NP-1E4	STD	ROX	32.62
D5	H1N1-2009-NP-1E5	STD	ROX	34.93
D4	H1N1-2009-NP-1E6	STD	ROX	40.11
D3	H1N1-2009-NP-1E7	STD	ROX	—



**ROX 通道扩增曲线图**  
(Y 轴: ROX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

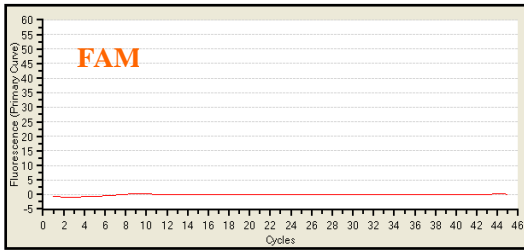


**标准曲线图**

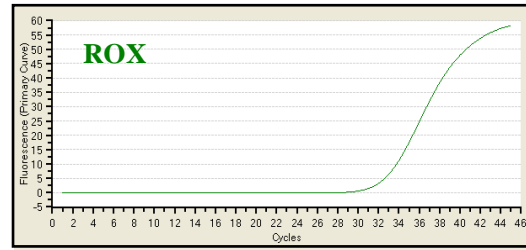
B. H1N1-2009-NA

【Negative Control】

Well	Sample Name	Sample Type	Filter	Ct(SDM)
F3	H1N1-2009-NA-H2O	NTC	FAM	—
F3	H1N1-2009-NA-H2O	NTC	ROX	33.05



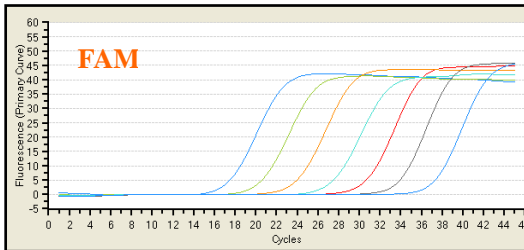
FAM 通道扩增曲线图  
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)



ROX 通道扩增曲线图  
(Y 轴: ROX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

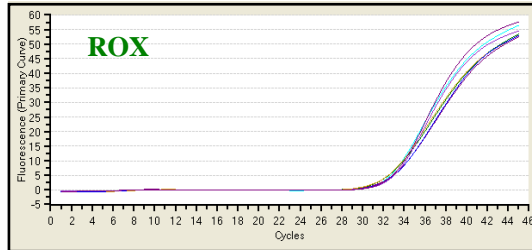
【Standard Curve】

Well	Sample Name	Sample Type	Filter	Ct(SDM)
C10	H1N1-2009-NA-1E1	STD	FAM	37.54
C8	H1N1-2009-NA-1E2	STD	FAM	34.14
B7	H1N1-2009-NA-1E3	STD	FAM	31.07
C6	H1N1-2009-NA-1E4	STD	FAM	27.81
C5	H1N1-2009-NA-1E5	STD	FAM	24.33
C4	H1N1-2009-NA-1E6	STD	FAM	20.78
C3	H1N1-2009-NA-1E7	STD	FAM	17.72

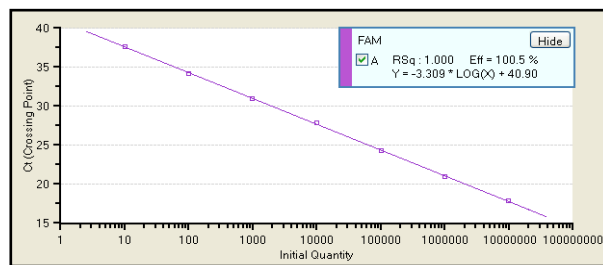


FAM 通道扩增曲线图  
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

Well	Sample Name	Sample Type	Filter	Ct(SDM)
C10	H1N1-2009-NA-1E1	STD	ROX	33.24
C8	H1N1-2009-NA-1E2	STD	ROX	33.19
B7	H1N1-2009-NA-1E3	STD	ROX	32.73
C6	H1N1-2009-NA-1E4	STD	ROX	33.13
C5	H1N1-2009-NA-1E5	STD	ROX	32.76
C4	H1N1-2009-NA-1E6	STD	ROX	32.87
C3	H1N1-2009-NA-1E7	STD	ROX	33.15



ROX 通道扩增曲线图  
(Y 轴: ROX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

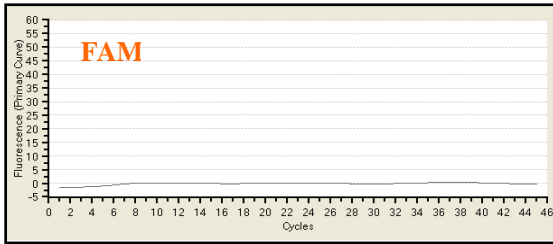


标准曲线图

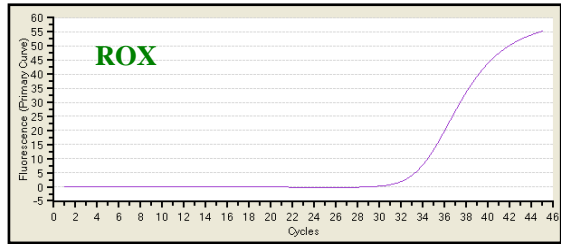
### C. H1N1-2009-HA

#### 【Negative Control】

Well	Sample Name	Sample Type	Filter	Ct(SDM)
A8	H1N1-2009-HA-H2O	NTC	FAM	-
A8	H1N1-2009-HA-H2O	NTC	ROX	33.60



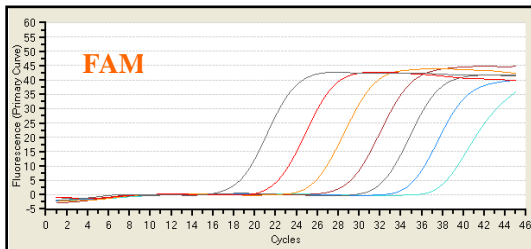
FAM 通道扩增曲线图  
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)



ROX 通道扩增曲线图  
(Y 轴: ROX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

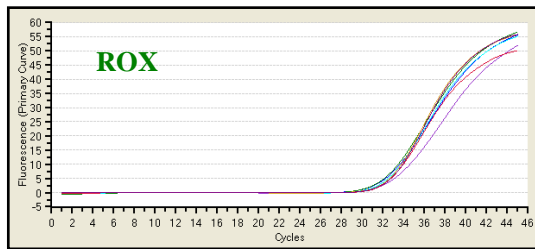
#### 【Standard Curve】

Well	Sample Name	Sample Type	Filter	Ct(SDM)
B4	H1N1-2009-HA-1E1	STD	FAM	37.92
C3	H1N1-2009-HA-1E2	STD	FAM	35.15
D3	H1N1-2009-HA-1E3	STD	FAM	32.43
E4	H1N1-2009-HA-1E4	STD	FAM	29.49
F4	H1N1-2009-HA-1E5	STD	FAM	25.98
G3	H1N1-2009-HA-1E6	STD	FAM	22.39
H4	H1N1-2009-HA-1E7	STD	FAM	18.88

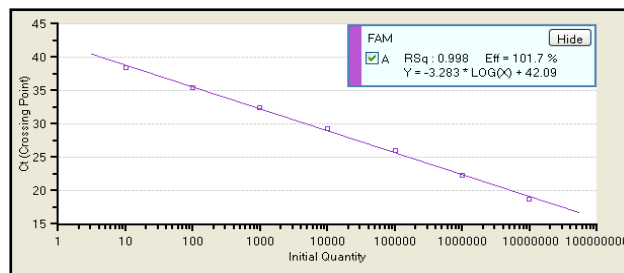


FAM 通道扩增曲线图  
(Y 轴: FAM 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)

Well	Sample Name	Sample Type	Filter	Ct(SDM)
B4	H1N1-2009-HA-1E1	STD	ROX	33.33
C3	H1N1-2009-HA-1E2	STD	ROX	32.64
D3	H1N1-2009-HA-1E3	STD	ROX	32.53
E4	H1N1-2009-HA-1E4	STD	ROX	32.72
F4	H1N1-2009-HA-1E5	STD	ROX	32.73
G3	H1N1-2009-HA-1E6	STD	ROX	32.91
H4	H1N1-2009-HA-1E7	STD	ROX	33.05



ROX 通道扩增曲线图  
(Y 轴: ROX 荧光信号值; X 轴: 循环圈数)



标准曲线图

#### 4. 结果分析。

请参见“结果判定”部分。

## ●结果判定

为确保检测结果的准确性，在进行实验样品检测时，请务必同时进行 Negative Control 实验和 Positive Control 实验。Negative Control 实验可以避免假阳性结果出现；Positive Control 实验可以避免假阴性结果出现。通过 Control RNA 制作的标准曲线，可以对实际样品进行定量分析。

1. Negative Control 实验。在配制 Negative Control Real Time PCR 反应液时，用 RNase Free dH<sub>2</sub>O 替代检测样品。对各种实验结果的判定情况说明见下表。

FAM 荧光	ROX 荧光	结果判定
-	+	结果正常。
-	-	可能是操作失败或试剂失活。
+	+	RT-PCR 反应体系污染。在确保反应体系不被污染的情况下再次进行反应。
+	-	

2. Positive Control 实验。制作标准曲线时，用 Control RNA 的各浓度梯度稀释液替代检测样品。对各种实验结果的判定情况说明见下表。

Control RNA	FAM 荧光	ROX 荧光	结果判定
10~10 <sup>2</sup>	+	+	结果正常
10 <sup>3</sup> ~10 <sup>7</sup>	+	- (+) *	
10~10 <sup>7</sup>	-	+	RT-PCR 反应失败。可能是探针或 Positive Control RNA 分解。
	-	-	RT-PCR 反应失败。可能是实验操作失败或试剂失活。

\* 如果检测样品浓度高有可能抑制 Internal Control 的扩增。

3. 实验样品的检测。对各种实验结果的判定情况说明见下表。

FAM 荧光			ROX 荧光	结果判定
NP 基因	NA 基因	HA 基因		
+	+	+	+ (-)	如果同时进行的 Negative Control 实验结果正常，检测实际样品时，不管是否有 ROX 荧光信号检出（如果检测样品浓度高会抑制 Internal Control 的扩增），只要有 FAM 荧光检出，判定为阳性。
+	+	-		
+	-	+		
-	+	+		
+	-	-		
-	+	-		
-	-	+		
-	-	-	+	如果同时进行的 Positive Control 实验结果正常，检测实际样品时有 ROX 荧光检出，无 FAM 荧光检出。判定为阴性或样品中病毒 RNA 含量低于检测界限。
-	-	-	-	RT-PCR 反应失败。注意以下几个方面后再次进行反应。 ① 如果同时进行的 Positive Control 实验结果正常，则可能是样品 RNA 制备有问题，如样品中可能存在 RT-PCR 反应的抑制物等。 ② 如果同时进行的 Positive Control 实验结果不正常，则可能是实验操作失败或试剂失活。

# MEMO

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686

8008909508, 4006518769

**宝生物工程（大连）有限公司**

**TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.**

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话： 0411-87641681 87641683

传 真： 0411-87619946 87621675

E.mail: [service@takara.com.cn](mailto:service@takara.com.cn)

网 址： <http://www.takara.com.cn>

V2010.04

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂