

**VetDetect
AIV H5
操作手册
产品编号: V02-01-1111R**

一步法 H5 亚型禽流感病毒荧光实时反转录 PCR
检测临床样本和环境样本

包括 50 个扩增反应所需的 Roche LightCycler® 试剂



修订 1
2009 年 7 月
海康生命科技有限公司

请在使用前通读操作手册

1. 试剂盒组成

- 2 x 400 µl AIV H5 荧光反应试剂 (Mastermix; -20°C 保存)
- 2 x 25 µl 阳性对照 (Positive Control; -20°C 保存)
- 1 x 20 µl Taq 酶 (Taq Polymerase; -20°C 保存)

保存条件

试剂需保存在零下 20°C。使用前在冰上溶解各试剂并充分混合，不要旋涡振荡含酶的荧光反应试剂。荧光反应试剂中的成分对光敏感，因此建议避光保存 (用铝箔纸包住试管)。

注意

反复冻融试剂可能降低试剂灵敏度。请按你检测的频密度将反应试剂以适当体积分管保存，以避免反复冻融。

2. 操作程序

反应的准备

- 实验中除从样本中获得的 RNA 模板外，我们还建议设置阳性和阴性 (水) 对照。
- 按照下表准备扩增反应试剂：

反应组分	每个反应体积
荧光反应试剂	15.6 µl
Taq 酶	0.4 µl
样品 RNA	4 µl
总体积	20 µl

注意:

- 建议使用与您的实时 PCR 仪器配套的 PCR 管及相关消耗品。
- 实验时 RNA 应放在冰上。
- 阳性对照建议加 4 µl 试剂盒提供的阳性对照。
- 建议 PCR 过程中检测样本设置重复，以便得到可靠的实验结果。
- 为了验证阴性实验结果不是由于样本中存有 PCR 抑制物而导致 PCR 呈阴性反应，我们建议实验过程中设置 spiking 对照*(spiking control)：在测试样本中加 1 µl 的阳性对照作为 spiking 对照，同时进行 PCR 反应。

PCR 循环:

			数据收集位点 (FAM 染料 / 530nm)
			LightCycler® Real-Time PCR System
1 个循环	42°C	30 分钟	-
	95°C	10 分钟	-
5 个循环	95°C	10 秒	-
	45°C	30 秒	-
	72°C	1 分钟	-
40 个循环	95°C	15 秒	-
	53°C	1 分钟	-

(于 □ 标示位点收集 FAM 读数)

3. 实验数据分析

详细的仪器操作说明请向您的 LightCycler® Real-Time PCR System 供应商索取。(此试剂盒用 ABI 7700 和 ABI 7300 研发)

一般来说：

- 阳性对照的 Ct 值应为 ≤32.0，并出现典型的扩增曲线；阴性对照 Ct 值为 40.0；否则视为实验结果无效，需重做。
- 检测样品的 Ct 值 ≤35.0，且出现典型的扩增曲线，结果有效，可直接报告样品为阳性。
- 检测样品的 Ct 值为 35.0 < Ct < 40.0 时，建议重做。重做结果 Ct 值为 40.0 者为阴性；若 Ct 值仍介于 35.0 和 40.0 之间，且扩增曲线有明显的指数增长特性者，可报告样品为阳性。

*Spiking 对照

阴性的实验结果有几个可能性：1. 样本中不存在目的片段；2. 样本中目的片段的量低于检测值；3. 样本中存有 PCR 抑制物。实验过程中设计 spiking 对照 (spiking control) 是为了确定没有发生 PCR 抑制。如果样本中加了阳性对照以后扩增结果的 Ct 值接近 40 (或者接近阴性对照的 Ct 值)，说明样本中存在 PCR 抑制物，那么此次阴性的实验结果就不能作为正确的结果，需要重新开始样本 RNA 的提取和 PCR 扩增。

如果你需要详细的资料，请与海康生命科技有限公司的技术支持联系。

4. 技术支持

在使用试剂盒过程中，如阁下有任何技术查询，在办公时间内可致电：

		中国大陆地区	其它国家/地区
电话：		+ (86) 10-5802 2828	+ (852) 2111 2123
办公 时间	周一至周五：	09:00-17:45	09:00-17:30
	周六：	-	09:00-13:00

工作日外的时间可以选择电话留言，或发传真、电邮与我们的技术人员联系。

传真号码： + (86) 10-5802 2500 (中国大陆地区)
+ (852) 2111 9762 (其它国家/地区)
电邮地址： technical@haikanglife.com
公司网址： <http://www.haikanglife.com>

5. 担保和责任

海康生命科技有限公司担保当使用方遵循以下条款时，本公司生产的产品原料和工艺不存在任何质量问题：1. 产品在出货日期一年或更短时间内使用，或在产品外包装上注明的有效期内使用；2. 产品储存条件完全符合技术指导 (或) 包装上的说明；3. 产品使用依照使用说明进行。海康生命科技有限公司发布的手册是指导产品购买者的唯一指定使用说明。每位产品购买者务必确保所获得的操作手册与其购买的产品配套。除此之外，海康生命科技有限公司不做其它明确或隐含的担保，如其它商业性或特殊用途。

前述担保的相关条款中，海康生命科技有限公司的唯一责任是：仅当购买者发现在遵循担保条款的情况下产品在原料或生产工艺上的质量问题，并且及时通知海康生命科技有限公司后，本公司将视情况而定，替换有缺陷的产品，或部分或全部退购物款。海康生命科技有限公司不对购买者或产品使用人的任何因产品缺陷、间接破坏而导致经济损失和财产损失负责。

注意：

PCR 技术采用罗氏公司 (F. Hoffman-La Roche, Inc.) 的美国专利技术。采用 PCR 技术需要获得许可，未经授权不得使用罗氏公司的任何专利技术。