

天
净
沙
系
列

CAT#:14-10200
低温运输, -20℃保存

BINGENE

丁型肝炎病毒染料法 qRT-PCR 试剂盒
HDV SYBR qRT-PCR Kit

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	丁型肝炎病毒（Hepatitis Delta Virus，HDV）是一种缺陷病毒，必须在 HBV 或其他嗜肝 DNA 病毒的辅助下才能复制增殖。HDV 与 HBV 重叠感染后，可促使肝损害加重，并易发展为慢性活动性肝炎、肝硬化和重型肝炎。HDV 的感染呈世界性分布，但主要分布于南意大利和中东等地区，主要通过输血、密切接触和母婴传播。HDV 给人类健康造成重大威胁，因此灵敏快捷的诊断产品具有重要的意义。本产品基于 PCR 原理开发。它具有下列特点： 1. 一站式，用于不需要单独准备每种成分，包括引物 and 对照。 2. 根据 HDV 的保守基因序列设计的引物，具有良好的特异性。 3. 基于染料法 qRT-PCR 检测，灵敏度比常规 RT-PCR 高 10-100 倍，可以达到至少 1000 拷贝/反应。 4. 使用一管式 qRT-PCR 技术，RT 和 PCR 两步在一个试管内完成，不需要中间转移样品，降低了操作误差和可能的污染。 5. 本产品足够 50 次 20uL 体系的 RT-PCR。 6. 本产品只能用于科研，不能用于临床。																								
规格及成分		<table><tr><th>成 份</th><th>编 号</th><th>五孔盒包装</th></tr><tr><td>2×染料法 qRT-PCR 缓冲液</td><td>190101a</td><td>500 uL（棕盖管）</td></tr><tr><td>10×染料法 qRT-PCR 酶混合液</td><td>190101b</td><td>100 uL（红盖管）</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>180701</td><td>1mL（绿黄盖）</td></tr><tr><td>丁型肝炎病毒 RT-PCR 引物混合液</td><td>Yw14-10200</td><td>100 uL（白盖管）</td></tr><tr><td>丁型肝炎病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/uL)</td><td>Pc14-10200</td><td>50 uL（黄盖管）</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>14-10200sc</td><td>1 份</td></tr></table>	成 份	编 号	五孔盒包装	2×染料法 qRT-PCR 缓冲液	190101a	500 uL（棕盖管）	10×染料法 qRT-PCR 酶混合液	190101b	100 uL（红盖管）	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL（绿黄盖）	丁型肝炎病毒 RT-PCR 引物混合液	Yw14-10200	100 uL（白盖管）	丁型肝炎病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/uL)	Pc14-10200	50 uL（黄盖管）	使用手册	14-10200sc	1 份		
成 份	编 号	五孔盒包装																							
2×染料法 qRT-PCR 缓冲液	190101a	500 uL（棕盖管）																							
10×染料法 qRT-PCR 酶混合液	190101b	100 uL（红盖管）																							
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL（绿黄盖）																							
丁型肝炎病毒 RT-PCR 引物混合液	Yw14-10200	100 uL（白盖管）																							
丁型肝炎病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/uL)	Pc14-10200	50 uL（黄盖管）																							
使用手册	14-10200sc	1 份																							
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。阳性对照需要因易污染其他成分需要单独放置。本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供 DNA 片段作为阳性对照。需要 RNA 阳性对照的需要单独订购。																								
自备试剂	样品 RNA																								
使用方法	一、稀释阳性对照（以 10E1-10E6 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）。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，只提供无传染性的的 DNA 片段作为阳性对照。 1. 标记 6 个离心管，分别为 6，5，4，3，2，1。用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。																								

	2. 在 6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(本试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。 3. 换枪头, 在 5 号管中加入 5 μL 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。 4. 换枪头, 在 4 号管中加入 5 μL 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10E4 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。 5. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。 二、样品 RNA 的制备 6. 如果有 N 个样品, 必须设置 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 10μL 上步制备的阳性对照梯度稀释液中的第 4 号 (浓度为 1×10E4 拷贝/μL, 10μL 相当于 1 万拷贝) 再加上一定量的水作为制备的阳性对照 (加水后其总体积跟样品一样, 样品体积多少取决于所用试剂盒的要求)。可以用水作为制备的阴性对照。 7. 用自选方法纯化 N+2 个样品的 RNA, 本试剂盒跟市场上大多数病毒 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、设置 RT-PCR 反应 (20μL 体系, 在样品制备室进行) 8. 如果只做 1 次重复, 则标记 N+9 个 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, 6 个用于做标准曲线的阳性对照。 9. 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, 阳性对照样品要等所有管子盖上盖子后最后加): <table><tr><th>成分</th><th>N+2 个制备所得样品</th><th>RT-PCR 阴性对照</th><th>RT-PCR 阳性对照 (1-6 管)</th></tr><tr><td>2×染料法 qRT-PCR 缓冲液</td><td>10μL</td><td>10μL</td><td>各 10μL</td></tr><tr><td>丁型肝炎病毒 RT-PCR 引物混合物</td><td>2μL</td><td>2μL</td><td>各 2μL</td></tr><tr><td>样品制备所得 RNA 模板 (来于第 7 步)</td><td>6μL</td><td>不加</td><td>不加</td></tr><tr><td>稀释所得 6 个阳性对照 (来于第 6 步)</td><td>不加</td><td>不加</td><td>各 6μL (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管…)</td></tr><tr><td>10×染料法 qRT-PCR 酶混合液</td><td>2μL</td><td>2μL</td><td>2μL</td></tr></table> 10. 上机后按下面参数进行 RT-PCR (参数可能会因仪器不同而需优化)。 <table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr></table>	成分	N+2 个制备所得样品	RT-PCR 阴性对照	RT-PCR 阳性对照 (1-6 管)	2×染料法 qRT-PCR 缓冲液	10μL	10μL	各 10μL	丁型肝炎病毒 RT-PCR 引物混合物	2μL	2μL	各 2μL	样品制备所得 RNA 模板 (来于第 7 步)	6μL	不加	不加	稀释所得 6 个阳性对照 (来于第 6 步)	不加	不加	各 6μL (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管…)	10×染料法 qRT-PCR 酶混合液	2μL	2μL	2μL	过程	温度	时间
成分	N+2 个制备所得样品	RT-PCR 阴性对照	RT-PCR 阳性对照 (1-6 管)																									
2×染料法 qRT-PCR 缓冲液	10μL	10μL	各 10μL																									
丁型肝炎病毒 RT-PCR 引物混合物	2μL	2μL	各 2μL																									
样品制备所得 RNA 模板 (来于第 7 步)	6μL	不加	不加																									
稀释所得 6 个阳性对照 (来于第 6 步)	不加	不加	各 6μL (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管…)																									
10×染料法 qRT-PCR 酶混合液	2μL	2μL	2μL																									
过程	温度	时间																										

	RT（逆转录）	50℃	30 分钟
	预变性	94℃	2 分钟
	RT-PCR 反应 (30 个循环)	95℃	15 秒
		60℃	15 秒（采集 SYBR 通道的荧光信号）
		72℃	15 秒
	按仪器预设程序进行溶解曲线分析		

四、数据处理

11. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。任何样品如果有 Ct 值，但 Tm 值跟阳性对照 Tm 不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，数据无效，不予以分析。Tm 跟阳性对照 Tm 一致的，为有效 Ct。如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 qRT-PCR 阴性对照）是属于这种情况（有 Ct 值但跟阳性对照的 Tm 不一样），则判为假阳性，不影响样品的分析，可以继续分析其它待测样品的数据。

12. 如果两种阴性对照（样本制备阴性对照和 RT-PCR 阴性对照）有 Ct 值，并且溶解曲线所得 Tm 值跟阳性对照的 Tm 值一样，说明环境或试剂可能有过去的 qRT-PCR 扩增产物污染，则此次实验无效，没有必要分析待测样品的数据，需要解决污染问题再进行实验。

13. 分析待测样品的数据。对定量检测，以阳性对照样品的浓度的 log 值为横轴，以有效 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效 Ct 值从标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的 log 值，再换算出待测样品的 RNA 浓度。对定性检测，则有 Ct 值并且 Tm 跟阳性对照一致的为阳性，无 Ct 值或有 Ct 值但 Tm 跟阳性对照不一致的判为阴性

关联产品

丁型肝炎病毒可视化 RT-LAMP 检测试剂盒