

天
净
沙
系
列

CAT#:14-53000
低温运输, -20℃保存

BINGENE

丙型肝炎病毒染料法 qRT-PCR 试剂盒

HCV 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: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	丙型病毒性肝炎，简称为丙型肝炎、丙肝，是一种由丙型肝炎病毒（Hepatitis C Virus，HCV）感染引起的病毒性肝炎，主要经血液传染，据世界卫生组织统计，全球 HCV 的感染率约为 3%，估计约 1.8 亿人感染了 HCV，每年新发丙型肝炎病例约 3.5 万例。丙型肝炎可导致肝脏慢性炎症坏死和纤维化，部分患者可发展为肝硬化甚至肝细胞癌，因此快速灵敏诊断具有重要意义。本产品以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测丙型肝炎病毒的试剂盒，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 HCV 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>丙型肝炎病毒 RT-PCR 引物混合液</td><td>Yw14-53000</td><td>100 uL（白盖管）</td></tr><tr><td>丙型肝炎病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/uL)</td><td>Pc14-53000</td><td>50 uL（黄盖管）</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>14-53000sc</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）	丙型肝炎病毒 RT-PCR 引物混合液	Yw14-53000	100 uL（白盖管）	丙型肝炎病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/uL)	Pc14-53000	50 uL（黄盖管）	使用手册	14-53000sc	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）																							
丙型肝炎病毒 RT-PCR 引物混合液	Yw14-53000	100 uL（白盖管）																							
丙型肝炎病毒 RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/uL)	Pc14-53000	50 uL（黄盖管）																							
使用手册	14-53000sc	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)。

- 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。
- 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。
- 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。
- 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

- 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。
- 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）

- 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。
- 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）：

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
丙型肝炎病毒 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

- 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）。

		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	丙型肝炎病毒可视化 RT-LAMP 检测试剂盒
-------------	-------------------------