

天
净
沙
系
列

CAT#:15-10200
低温运输, -20℃保存

BINGENE

丁型肝炎病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒

Hepatitis D Virus Probe 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	丁型肝炎(hepatitis D 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。经核酸分子杂交技术证明，HDV RNA 与 HBV DNA 无同源性，也不是宿主细胞的 RNA。HDV—RNA 的分子小量很小，只有 5.5×10^5，这决定了 HDV 的缺陷性，不能独立复制增殖。其传播方式主要通过输血或使用血制品，也可通过密切接触与母婴间垂直感染等方式传播。高危人群包括药瘾者及多次受血者。迄今，对 HDV 感染尚无特效治疗药物。因此快速灵敏诊断丁型肝炎病毒具有重要意义。本产品就是以探针法荧光定量 RT-PCR 技术为基础开发的专门检测丁型肝炎病毒的试剂盒，它具有下列特点： 1. 即开即用，用户只需要提供样品 RNA 模板。 2. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/反应。 3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。 4. 特异性高，引物是根据丁型肝炎病毒 RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。 5. 涵盖性好，可以扩增丁型肝炎病毒的绝大多数亚型。 6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 各数量级。 7. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。 8. 本产品只能用于科研。		
规格及成分	成分	编号	五孔盒包装
	探针法 qRT-PCR 缓冲液	190504a	500 μ L (蓝盖管)
	探针法 qRT-PCR 酶混合液	190504b	100 μ L (红盖管)
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (绿盖管)
	丁型肝炎病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	yp15-10200flg	150 μ L (棕色管)
	丁型肝炎病毒 RT-PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E7 拷贝/ μ L)	pc10200-MT583812	50 μ L (黄盖管)
	使用手册	15-10200sc	1 份
运输及保存	低温运输，-20 $^{\circ}$ C 保存，保存期限为 12 个月。		
自备试剂	样品 RNA。		

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以 $10E1$ - $10E6$ 拷贝/ μL 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 DNA 片段作为阳性对照。如果需要 RNA 阳性样品，需要另外订购。

1. 标记 6 个离心管，分别为 6，5，4，3，2，1。
2. 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）。
3. 在 6 号管中加入 5 μL $1 \times 10E7$ 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E6$ 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL $1 \times 10E6$ 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E5$ 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL $1 \times 10E5$ 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E4$ 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

二、样品 RNA 的制备

7. 如果有 N 个样品，最好设置 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 10 μL 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。
8. 用自选方法纯化样品的 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 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、Probe qRT-PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 个 RT-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（用水做模板），6 个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复，则标记 N+4 个 RT-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（用水做模板），1 个用于 RT-PCR 阳性对照（直接用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
10. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后最后加）：

	成分	样品管 N+2 个	RT-PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)													
	探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10μL	10μL	各 10μL													
	探针法 qRT-PCR 酶混合液	各 2μL	2μL	各 2μL													
	丁型肝炎病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL													
	N+2 个待测 RNA 样本	各 5 μL	不加	不加													
	超纯水	不加	5 μL	不加													
	第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 5μL (2 号样 到 2 号管, 3 号 样到 3 号管…)													
	11. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 RT-PCR:																
<table><tr><td>过程</td><td>温度</td><td>时间</td></tr><tr><td>逆转录</td><td>50℃</td><td>15 min</td></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>10 min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>95℃</td><td>15 sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 MGB)</td></tr></table>				过程	温度	时间	逆转录	50℃	15 min	预变性	95℃	10 min	PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec	60℃	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 MGB)
过程	温度	时间															
逆转录	50℃	15 min															
预变性	95℃	10 min															
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec															
	60℃	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 MGB)															
四、数据处理																	
12. 如果把本试剂盒用于定量检测, 则以阳性对照浓度的 log 值为横轴, 以 Ct 值为纵轴, 绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的 log 值, 再推算出其浓度。																	
13. 如果把本试剂盒用于定性检测, 只判断阳性或阴性, 则阴性对照 Ct 必须大于等于 40 或者为零。阳性对照必须有荧光对数增长, 有典型扩增曲线, Ct 值应该小于 40。对待测样品, 如果其 Ct 小于 40 则为阳性。如果在大于或等于 40 则为阴性。																	
关联产品	丁型肝炎病毒荧光及可视化 RT-LAMP 检测试剂盒																