

天
净
沙
系
列

CAT#:15-55900
低温运输, -20℃保存

BINGENE

乙型肝炎病毒前基因组 RNA 探针法 qRT-PCR 试剂盒

Hepatitis B Virus Pregenomic RNA 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	乙型肝炎病毒前基因组 RNA 简称 HBV pgRNA (Hepatitis B Virus pregenomic RNA, pgRNA), 它是肝细胞内 HBV cccDNA 转录得到的 RNA。研究显示, 对治疗中的慢性乙型肝炎患者, 当病毒的逆转录和 DNA 合成被抑制后, 其血清中的 HBV RNA 水平能反映肝细胞内 cccDNA 的存在及其转录活性, 而且还证实了慢性乙型肝炎患者血清中存在的 HBV RNA 为 3.5kb 大小的前基因组 RNA, 这些 pgRNA 是以 HBV RNA 病毒样颗粒形式存在于成熟病毒颗粒的核衣壳内, 并和持续的病毒感染及病毒学反弹风险相关, 因此快速灵敏诊断乙型肝炎病毒前基因组 RNA 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乙型肝炎病毒前基因组 RNA 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 1000 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, 引物是根据乙型肝炎病毒前基因组 RNA 高度保守区设计, 可以检测乙型肝炎病毒前基因组 RNA, 不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。 5. 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 个数量级。 6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。 7. 本产品只能用于科研。			
规格及成分	本产品使用五孔盒包装			
	成分	编号	规格	包装材料
	探针法 qRT-PCR 缓冲液	990504a	500μL	0.5mL 蓝盖管
	探针法 qRT-PCR 酶混合液	990504b	100μL	0.5mL 红盖管
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL	1.5mL 绿盖管
	乙型肝炎病毒前基因组 RNA qRT-PCR 引物-探针混合液	yp15-55900mg	150μL	0.5mL 棕色管
	乙型肝炎病毒前基因组 RNA RT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc55900mg	50μL	0.5mL 黄盖管
	使用手册	15-55900sc	1 份	无
运输及保存	低温运输, -20℃保存, 保存期限为 12 个月。			
自备试剂	超纯水, 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。

- 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 45μL 荧光 RT-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 5μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 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 5μL 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 的标准曲线样品。放冰上待用。
- 5. 换枪头，在 4 号管中加入 5μL 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 10μL 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相关 RNA 提取产品或免提取核酸释放剂。

三、Probe qRT-PCR 反应（20μL 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	RT-PCR	标准曲线样品管
----	-----	--------	---------

		N+2 个	阴性对照	(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													
	乙型肝炎病毒前基因组 RNA qRT-PCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL													
	N+2 个待测 RNA 样本	各 5μL	不加	不加													
	超纯水	不加	5μL	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 (1 号样到 1 号管, 2 号样到 2 号管…)													
	11. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 RT-PCR:																
<table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>逆转录</td><td>50℃</td><td>15min</td></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>10min</td></tr><tr><td rowspan="2">RT-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 BHQ1)</td></tr></table>				过程	温度	时间	逆转录	50℃	15min	预变性	95℃	10min	RT-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 BHQ1)
过程	温度	时间															
逆转录	50℃	15min															
预变性	95℃	10min															
RT-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 BHQ1)															
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。如果没有 Ct 值, 或者大于或等于 40 则为阴性。																	
关联产品	乙型肝炎病毒前基因组 RNA 探针法荧光定量 PCR 检测试剂盒																