

天
净
沙
系
列

CAT#:15-87800
低温运输, -20℃保存

BINGENE

人类嗜 T 淋巴细胞病毒通用探针法 qRT-PCR 试剂盒
Human T-cell Lymphoma 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: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

<p>产品及特点</p>	<p>人类嗜 T 淋巴细胞病毒前病毒(Human T-cell Lymphoma Virus Provirus , HTLV) 是一种致瘤性病毒, 现该病毒可引起人类多种疾病, 如成人 T 细胞白血病/淋巴瘤 (ATL)、热带痉挛性截瘫/HTLV 相关性脊髓病等; HTLV-II 与 T-多毛细胞/巨粒细胞白血病等疾病相关, 至今尚无有效治疗方法及抗病毒药物, 因此对人类嗜 T 淋巴细胞病毒快速准确鉴定对该病的预防和检疫有着重要作用。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人类嗜 T 淋巴细胞病毒的试剂盒, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即开即用, 用户只需要提供样品 RNA 模板。 2. 特异性高, 引物是根据人类嗜 T 淋巴细胞病毒高度保守区设计, 不会跟其它病毒的 RNA 发生交叉反应。 3. 引物和探针经过优化, 灵敏度高。 4. 可以检测 1 型和 2 型的 HTLV 病毒。 5. 一管式荧光定量 RT-PCR 检测, 避免后续污染。 6. 既可以用于定性检测, 又可以用于定量检测, 用于定量检测时其线性范围至少有 5 个数量级。 7. 本试剂盒足够 50 次 20μL 反应体系的荧光定量 RT-PCR 反应。 8. 本产品只能用于科研。 																							
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="400 1205 874 1267">成分</th> <th data-bbox="874 1205 1129 1267">编号</th> <th data-bbox="1129 1205 1407 1267">五孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="400 1267 874 1330">探针法 qRT-PCR 缓冲液</td> <td data-bbox="874 1267 1129 1330">990504a</td> <td data-bbox="1129 1267 1407 1330">500μL (蓝盖)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="400 1330 874 1393">探针法 qRT-PCR 酶混合液</td> <td data-bbox="874 1330 1129 1393">990504b</td> <td data-bbox="1129 1330 1407 1393">100μL (红盖)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="400 1393 874 1456">荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td data-bbox="874 1393 1129 1456">180701</td> <td data-bbox="1129 1393 1407 1456">1 mL (绿盖)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="400 1456 874 1541">HTLV 病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液</td> <td data-bbox="874 1456 1129 1541">yp15-87800</td> <td data-bbox="1129 1456 1407 1541">150μL (棕色管)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="400 1541 874 1626">HTLV 病毒 qRT-PCR 阳性对照 (1\times10E7 拷贝/μL)</td> <td data-bbox="874 1541 1129 1626">pc87800</td> <td data-bbox="1129 1541 1407 1626">50μL (黄盖)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="400 1626 874 1693">使用手册</td> <td data-bbox="874 1626 1129 1693">15-87800sc</td> <td data-bbox="1129 1626 1407 1693">1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	五孔盒包装	探针法 qRT-PCR 缓冲液	990504a	500 μ L (蓝盖)	探针法 qRT-PCR 酶混合液	990504b	100 μ L (红盖)	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (绿盖)	HTLV 病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	yp15-87800	150 μ L (棕色管)	HTLV 病毒 qRT-PCR 阳性对照 (1 \times 10E7 拷贝/ μ L)	pc87800	50 μ L (黄盖)	使用手册	15-87800sc	1 份
成分	编号	五孔盒包装																						
探针法 qRT-PCR 缓冲液	990504a	500 μ L (蓝盖)																						
探针法 qRT-PCR 酶混合液	990504b	100 μ L (红盖)																						
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (绿盖)																						
HTLV 病毒 qRT-PCR 引物-探针混合液	yp15-87800	150 μ L (棕色管)																						
HTLV 病毒 qRT-PCR 阳性对照 (1 \times 10E7 拷贝/ μ L)	pc87800	50 μ L (黄盖)																						
使用手册	15-87800sc	1 份																						
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输、-20$^{\circ}$C 保存, 保存期限为 12 个月。</p>																							
<p>自备试剂</p>	<p>样品 RNA。</p>																							

使用方法

一、稀释 PCR 阳性对照 (以 10E1-10E6 拷贝/ μ L 这 6 个 10 倍稀释度为例)

如果做定性实验,则此步可以跳过。如果做定量实验,则需要稀释阳性对照做标准曲线。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 45 μ L 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 μ L 1 \times 10E7 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供),充分震荡 1 分钟,得 1 \times 10E6 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头,在 5 号管中加入 5 μ L 1 \times 10E6 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1 \times 10E5 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头,在 4 号管中加入 5 μ L 1 \times 10E5 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1 \times 10E4 拷贝/ μ L 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。放冰上用。

二、样品 RNA 的制备

7. 如果有 N 个样品,必须设置 N+2 个提取,多出的一个是样品制备 PC(样品制备阳性对照),一个是样品制备 NC(样品制备阴性对照)。可以用 10 μ L 上步所得第 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样品体积一样,以此作为样品制备 PC。另外用水作为样品制备 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。

三、Probe qRT-PCR 反应 (20 μ L 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 PCR 管,其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品,1 个用于 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 PCR 管,其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品,1 个用于 PCR 阴性对照(用水做模板),1 个用于 PCR 阳性对照(用第 4 号管中的阳性对照稀释液做模板)。下面只以定量分析为描述操作步骤,
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	PCR 阴性 对照管	PCR 阳性 对照管 (1-6 管)
----	--------------	---------------	-----------------------

探针法 qRT-PCR 缓冲液	10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
探针法 qRT-PCR 酶混合液	2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
HTLV 病毒探针法 qRT-PCR 引物-探针混合液	3 μ L	3 μ L	各 3 μ L
N+2 个待测 RNA 模板	5 μ L	-	-
超纯水	-	5 μ L	-
第 7 步所得标准曲线样品稀 释液 (1-6 号)	-	-	各 5 μ L (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 qRT-PCR:

过程	温度	时间
逆转录	42 $^{\circ}$ C	30min
预变性	94 $^{\circ}$ C	10min
PCR 反应 (45 个循环)	94 $^{\circ}$ C	15sec
	55 $^{\circ}$ C	30sec (采集 FAM 通道的荧光信号, BHQ1 为淬灭基团)

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, 则阴性对照必须没有 Ct 或者 Ct 大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长, 有典型扩增曲线, Ct 值应该小于或等于 40。对待测样品, 如果其没有 Ct 或者 Ct 大于或等于 40 则为阴性, 如果小于或等于 40 则为阳性。

关联产品

HTLV 病毒通用可视化 RT-LAMP 检测试剂盒