

天
净
沙
系
列

CAT#:15-87810
低温运输, -20℃保存

BINGENE

人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型探针法 qRT-PCR 试剂盒
Human T-cell Lymphoma Virus 1 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	人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 (Human T-lymphotropic Virus 1, HTLV 1) 主要感染人 CD4+T 淋巴细胞,可引起成人 T 淋巴细胞白血病/淋巴瘤、HTLV 相关脊髓病 (HTLV-I associated myelopathy , HAM/ 热带痉挛性下肢瘫, tropical spastic paraparesis TSP) 及色素层炎。它主要通过输血、针头、性行为、母子传染。因此快速检测 HTLV-I 病毒具有重要的意义。本产品就是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的 HTLV-I 病毒探针法荧光定量 RT-PCR 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。 3. 提供阳性对照,便于区分假阴性样品。 4. 特异性高,引物是根据人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 RNA 高度保守区设计,不会跟其他病毒的 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 体系的探针法荧光定量 RT-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 <table><tr><th>成分</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>探针法 qRT-PCR 缓冲液</td><td>990504a</td><td>500μL</td><td>0.5mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>探针法 qRT-PCR 酶混合液</td><td>990504b</td><td>100μL</td><td>0.5mL 红盖管</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>180701</td><td>1mL</td><td>1.5mL 绿盖管</td></tr><tr><td>人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 探针法 qRT-PCR 引物-探针 混合液</td><td>yp15-87810</td><td>150μL</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr><tr><td>人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 探针法 qRT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)</td><td>pc87810- AB979451</td><td>50μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>15-87810sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>	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	人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 探针法 qRT-PCR 引物-探针 混合液	yp15-87810	150μL	0.5mL 棕色管	人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 探针法 qRT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc87810- AB979451	50μL	0.5mL 黄盖管	使用手册	15-87810sc	1 份	无
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																										
人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 探针法 qRT-PCR 引物-探针 混合液	yp15-87810	150μL	0.5mL 棕色管																										
人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 探针法 qRT-PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc87810- AB979451	50μL	0.5mL 黄盖管																										
使用手册	15-87810sc	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	样品 RNA。																												

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以 $10E1$ - $10E6$ 拷贝/ μ L 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 45 μ L 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 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，多出的是 PC（样品制备阳性对照）和 NC（样品制备阴性对照）。可以取上步所得的第 4 号稀释液 10 μ L 再加上一定量的水，使总体积与核酸纯化试剂盒所要求的起始样品体积一致，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、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 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（用第 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 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													
	人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 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>30 min</td></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>10 min</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 BHQ)</td></tr></table>				过程	温度	时间	逆转录	50℃	30 min	预变性	95℃	10 min	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 BHQ)
过程	温度	时间															
逆转录	50℃	30 min															
预变性	95℃	10 min															
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 BHQ)															
五、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 Ct 小于 40 则为阳性, 如果没有 Ct, 或者 Ct 大于或等于 40 则为阴性。																	
关联产品	人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒																