

## 乙型肝炎病毒A型探针法qPCR试剂盒（不含内参）

### Hepatitis B Virus Type A Probe PCR Kit

CAT#:BN62860

低温运输，-20℃保存

#### 产品及特点

乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus, HBV）属嗜肝 DNA 病毒科。HBV 为部分双链环状 DNA，基因组长度约为 3.2 kb，是引起乙型肝炎（简称乙肝）的病原体。基于病毒全基因组序列差异，将 HBV 划分为 A~J 共 10 种基因型，不同基因型的 HBV 病毒株可以通过共感染发生重组，产生新的重组亚型。HBV 感染是全球性的公共卫生问题，其中 A 型在慢性感染中最常见，因此乙型肝炎病毒 A 型的快速检测具有重要意义，为此本公司以探针法 qPCR 技术为基础开发了乙型肝炎病毒 A 型的检测试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品DNA模板。
2. 引物和探针经过优化，灵敏度高，最低检测限可达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，引物是根据乙型肝炎病毒A型基因组DNA高度保守区设计，不会跟其它生物的DNA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5个数量级。
6. 本产品足够50次20 μL体系的探针法荧光定量PCR反应。
7. 本产品只能用于科研。

#### 规格及成分

| 成分                            | 编号      | 规格     | 包装     |
|-------------------------------|---------|--------|--------|
| 2×Probe qPCR MasterMix        | 60001   | 500 μL | 0.5 mL |
| 荧光PCR专用模板稀释液                  | 60002   | 1 mL   | 1.5 mL |
| 超纯水                           | 60003   | 1 mL   | 1.5 mL |
| 乙型肝炎病毒 A 型<br>qPCR 引物-探针干粉    | 62860-4 | 50 次   | 0.5 mL |
| 乙型肝炎病毒 A 型<br>阳性对照(1E7 拷贝/μL) | 62860-5 | 50 μL  | 0.5 mL |
| 使用手册                          |         | 1 份    | 1 份    |

注意：引物-探针干粉在使用前需要离心，然后在离心管中加入165 μL的超纯水充分

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              | 混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>运输及保存</b> | 低温运输，-20℃保存，保存期限为12个月。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>自备物品</b>  | 超纯水，样品DNA。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>使用方法</b>  | <p><b>一、稀释标准曲线样品（以1E1-1E6拷贝/μL这6个10倍稀释度为例）。</b></p> <p>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。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。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 标记6个离心管，分别为6、5、4、3、2、1。</li> <li>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）。</li> <li>3. 在6号管中加入5 μL 1E7拷贝/μL的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡混匀1分钟，得到1E6拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>4. 换枪头，在5号管中加入5 μL 1E6拷贝/μL的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡混匀1分钟，得到1E5拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>5. 换枪头，在4号管中加入5 μL 1E5拷贝/μL的阳性对照(上步所得)，充分震荡混匀1分钟，得到1E4拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>6. 依次重复上面的操作得到6个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。</li> </ol> <p><b>二、样品DNA的制备</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>8. 用自选方法纯化样品的DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品DNA提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。</li> </ol> <p><b>三、qPCR 反应（20 μL体系，在样品制备室进行）</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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</li> </ol> |

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<br>N+3个 | PCR阴性<br>对照管 | 标曲样品管<br>(1-6)                  |
|-----------------------------|-------------|--------------|---------------------------------|
| 2×Probe qPCR<br>MasterMix   | 各10 μL      | 10 μL        | 各10 μL                          |
| 乙型肝炎病毒 A 型<br>qPCR 引物-探针混合液 | 各3 μL       | 3 μL         | 各3 μL                           |
| 待测样本DNA模板                   | 7 μL        | 不加           | 不加                              |
| 超纯水                         | 不加          | 7 μL         | 不加                              |
| 第6步所得标准曲线样品稀<br>释液（1-6号）    | 不加          | 不加           | 各7 μL（1号样<br>到1号管，2号<br>样到2号管…） |

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行PCR：

| 过程               | 温度  | 时间                          |
|------------------|-----|-----------------------------|
| 预变性              | 95℃ | 5 min                       |
| PCR反应<br>(45个循环) | 95℃ | 15 sec                      |
|                  | 60℃ | 1 min<br>(采集FAM通道，淬灭基团为MGB) |

#### 四、数据处理

12. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系，购买新的引物和探针。
13. 如果阴性对照和阳性对照正常，则实验有效，可以进入后续分析。
14. 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DNA浓度的log值，再推算出其浓度。

- 
- |  |                                                                                                                                                 |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p>15. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照必须无Ct或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40，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无Ct或Ct大于或等于40，则为阴性。如果Ct小于40则为阳性。</p> |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
-