

丁型肝炎病毒探针法qRT-PCR试剂盒

Hepatitis D Virus Probe qRT-PCR Kit

CAT#:BN62884

低温运输, -20℃保存

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20 μ L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	60001	500 μ L
探针法qRT-PCR酶混合液	60002	100 μ L
荧光PCR专用模板稀释液	60003	1 mL
丁型肝炎病毒qRT-PCR引物-探针混合液	62884-4	150 μ L
丁型肝炎病毒RT-PCR阳性对照 (1×10^7 拷贝/ μ L)	62884-5	50 μ L)
使用手册		1份

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

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/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 1×10E7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5 μL 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5 μL 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
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：

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。