

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

CAT#:BN63223

低温运输，-20℃保存

产品及特点

人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 (Human T-lymphotropic Virus 1, HTLV 1) 8.

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，分析灵敏度高，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 20 μL 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

成分	编号	规格
探针法 qRT-PCR 缓冲液	60001	500 μL
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	60002	50 μL
荧光 PCR 专用模板稀释液	60003	1 mL
人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 qRT-PCR 引物-探针干粉	63223-4	50 次
人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 qRT-PCR 阳性对照 (1E7 拷贝/μL)	63223-5	50 μL

注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165 μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。

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 1E1-1E6 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 45 μL 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 μL 1E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1E6 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 1E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E5 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 1E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E4 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 μL 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 μL 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	16

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 10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	各 1 μ L	1 μ L	各 1 μ L
人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 qRT-PCR 引物-探针混合液	各 3 μ L	3 μ L	各 3 μ L
N+2 个待测 RNA 样本	各 6 μ L	不加	不加
超纯水	不加	6 μ L	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 6 μ L (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 $^{\circ}$ C	10 min
预变性	95 $^{\circ}$ C	10 min
RT-PCR 反应 (45 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15 sec
	60 $^{\circ}$ C	60 sec (采集 FAM 通道的荧光 信号, 淬灭基团为 BHQ)

注: 部分 (如: 伯乐 CFX96) 机型如果两步法效果不理想可采用三步法: 50 $^{\circ}$ C 10 分钟, 95 $^{\circ}$ C 10 分钟, (95 $^{\circ}$ C 15 秒、55 $^{\circ}$ C 15 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒) 循环 35-45 次, 每个循环第三步采集荧光信号。

四、数据处理

12. 如果样本制备阳性对照或 PCR 阳性对照 (包括标曲样本) 结果为阴性, 则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要重新样本制备, 重新进行 PCR 扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或 PCR 阴性对照结果为阳性, 说明环境污染, 则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要跟厂家联系。
13. 如果阴性对照和阳性对照均正常, 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 RNA

浓度的 log 值，再推算出其浓度。

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。