

人类内源性逆转录病毒 K 家族探针法 qRT-PCR 试剂盒（含内参）

Human Endogenous Retroviruses K family Probe qRT-PCR Kit

CAT#:BN66045

低温运输，-20℃保存

产品及特点	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内源性逆转录病毒 K 家族（HERV-K）的含内参试剂盒，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，便于制备标准曲线和用作扩增对照，排除假阴性结果。 4. 含识别内源性内参的引物和探针，便于排除 RT-PCR 假阴性结果。 5. 特异性高，靶分子的引物和探针是根据 HERV-K RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。 6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。 7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 RT-PCR 反应。 8. 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></tr><tr><td>探针法 qRT-PCR 缓冲液</td><td>60001</td><td>500 μL</td></tr><tr><td>探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2</td><td>60002</td><td>50 μL</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>60003</td><td>1 mL</td></tr><tr><td>HERV-K qRT-PCR 引物-探针干粉（含内参引物探针）</td><td>6000-4</td><td>50 次</td></tr><tr><td>HERV-K qRT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)</td><td>6000-5</td><td>50 μL</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>6000-6</td><td>1 份</td></tr></table> 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 220 μL 的超纯水充分混匀后的得到引物-探针混合液再使用，未用完的需要-20℃保存。	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	HERV-K qRT-PCR 引物-探针干粉（含内参引物探针）	6000-4	50 次	HERV-K qRT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	6000-5	50 μL	使用手册	6000-6	1 份
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																				
HERV-K qRT-PCR 引物-探针干粉（含内参引物探针）	6000-4	50 次																				
HERV-K qRT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	6000-5	50 μL																				
使用手册	6000-6	1 份																				
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。																					

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例）。

1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。
2. 在各管中加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液。
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. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线阳性样品。放冰上待用。

二、样品 RNA 的制备

6. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是制备 PC（样品制备阳性对照），一个是制备 NC（样品制备阴性对照）。可以用确认是阳性的样本作为阳性对照，用确认是阴性的样本作为阴性对照。
7. 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（20 μL 体系，在样品制备室进行）

8. 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 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 5 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。

9. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复）：

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 μL	10 μL	各 10 μL
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	各 1 μL	1 μL	各 1 μL
HERV-K qRT-PCR 引物-探针混合液(含内参引物和探针)	各 4 μL	4 μL	4 μL
N+2 个待测样（含内源性内参）	各 5 μL	不加	不加
超纯水	不加	5 μL	不加

第 5 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 5 μ L (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管...)
-----------------------------	----	----	---

10. 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	4 min
RT-PCR 反应 (45 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15 sec
	60 $^{\circ}$ C	45 sec (采集 FAM 通道和 Cy5 通道的 荧光信号, 淬灭基团均为 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, 94 $^{\circ}$ C 2 分钟 (94 $^{\circ}$ C 15 秒、52 $^{\circ}$ 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

11. 阴性阳性判断: 没有 Ct 读数, 或 Ct 大于 40 判为阴性结果。有 Ct 读数, Ct 值小于 40, 荧光信号有对数增长, 有典型扩增曲线判为阳性结果。每个样本需要对 FAM 通道和 Cy5 通道的结果分别进行判定, 得到两个结果。
12. 实验有效性判断: 如果扩增阳性对照或制备阳性对照 FAM 通道结果为阴性则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要分析原因, 可能是操作、仪器和试剂三方面的原因, 重做扩增或制备或跟仪器和试剂厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照 FAM 通道结果为阳性, 说明环境污染, 则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要分析失败原因, 直到污染消除。如果阳性对照和阴性对照正常, 则进入下一步分析样本的有效性。
13. 样本有效性判断: 如果样本 FAM 通道的结果为阳性, 则无论内参通道的结果是阴性还是阳性, 样本的结果均有效。如果样本结果为阴性, 内参通道结果也为阴性, 则此样品的阴性结果无效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。
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, 分别以阳性对照 FAM 通道和内参通道的 Ct 值为纵轴, 绘制标准曲线, 阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线为斜线, r^2 必须大于 0.95, 内参通道读数的标准曲线为一条跟 X 轴平行的横线。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的 log 值, 再推算出其浓度。

	15. 如果用于定性实验，对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 没有读数、或 Ct 大于或等于 40 则均为阴性，如果小于 40 则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的待测样本，如果其对应的内参通道也为阴性，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。
关联产品	人类内源性逆转录病毒 K 家族可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒