



## 乙型肝炎(乙脑)病毒探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

### 产品及特点:

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, 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, 引物是根据乙型肝炎(乙脑)病毒高度保守区设计, 不会跟其他病毒的 RNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的探针法荧光定量 RT-PCR 反应。
6. 本产品只能用于科研。

### 规格及成分:

| 编号  | 成分   | 规格               |
|-----|--|------------------|
| 试剂一 | 探针法 qRT-PCR 缓冲液  | 500 $\mu$ L (蓝盖) |
| 试剂二 | 探针法 qRT-PCR 酶混合液   | 100 $\mu$ L (红盖) |
| 试剂三 | 荧光 PCR 专用模板稀释液   | 1 mL (黄盖)        |
| 试剂四 | 乙型肝炎(乙脑)病毒探针法 qRT-PCR 引物混合液                                | 100 $\mu$ L (白盖) |
| 试剂五 | 乙型肝炎(乙脑)病毒 qRT-PCR 探针                                      | 50 $\mu$ L (棕色管) |
| 试剂六 | 乙型肝炎(乙脑)病毒探针法 qRT-PCR 阳性对照<br>( $1 \times 10^8$ / $\mu$ L) | 50 $\mu$ L (黄盖)  |
|     | 使用手册   | 1 份              |

### 运输及保存:

低温运输, -20 $^{\circ}$ C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 $10E2-10E7$ 拷贝/ $\mu$ 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 7, 6, 5, 4, 3, 2。
2. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu$ L 荧光 RT-PCR 专用模板稀释液,最好用带芯枪头,下同)。
3. 在 7 号管中加入 5  $\mu$ L  $1 \times 10E8$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供),充分震荡 1 分钟,得  $1 \times 10E7$  拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头,在 6 号管中加入 5  $\mu$ L  $1 \times 10E7$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得  $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头,在 5 号管中加入 5  $\mu$ L  $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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 DNA 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 10 $\mu$ L 阳性对照的 10000 倍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病毒 RNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的柱式病毒 RNAout。

**三、Probe qRT-PCR 反应 (20 $\mu$ 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 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):

| 成份                         | 样品管<br>N+2 个 | RT-PCR 阴<br>性对照管 | 标准曲线样品管<br>(2-7 管)                   |
|----------------------------|--------------|------------------|--------------------------------------|
| 探针法 qRT-PCR 缓冲液            | 各 10 $\mu$ L | 10 $\mu$ L       | 各 10 $\mu$ L                         |
| 探针法 qRT-PCR 酶混合液           | 各 2 $\mu$ L  | 2 $\mu$ L        | 各 2 $\mu$ L                          |
| 乙型脑炎(乙脑)病毒 qRT-PCR 探针      | 各 1 $\mu$ L  | 1 $\mu$ L        | 各 1 $\mu$ L                          |
| 乙型脑炎(乙脑)病毒探针 qRT-PCR 引物混合液 | 各 2 $\mu$ L  | 2 $\mu$ L        | 各 2 $\mu$ L                          |
| 待测样品 RNA 模板                | 各 5 $\mu$ L  | --               | --                                   |
| 超纯水                        | --           | 5 $\mu$ L        | --                                   |
| 第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)   | 不加           | 不加               | 各 5 $\mu$ 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 qRT-PCR:

| 过程  | 温度              | 时间     |
|-----|-----------------|--------|
| 逆转录 | 50 $^{\circ}$ C | 30 min |
| 预变性 | 94 $^{\circ}$ C | 10 min |



|                   |      |                         |
|-------------------|------|-------------------------|
| qRT-PCR 反应 35 个循环 | 94°C | 15 sec                  |
|                   | 60°C | 1 min, (采集 FAM 通道的荧光信号) |

#### 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 30。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性，如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性，如果小于 40，则为阳性。

**上海纪宁实业有限公司([www.shjning.com](http://www.shjning.com))所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。**