人类嗜 T 淋巴细胞病毒前病毒通用染料法荧光定量 PCR 试剂盒

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

咨询QQ ： 2881498726

订购热线 ： 021 - 54720761

咨询电话 ： 13166274223(微信同号)

产品及特点:

人类嗜 T 淋巴细胞病毒(Human T-cell Lymphoma Virus，HTLV)是一种致瘤性 RNA 病毒，属慢病毒亚科，可分为Ⅰ型和Ⅱ型。近来发现该病毒在人类可引起多种疾病：Ⅰ型可引起成人 T 细胞白血病/淋巴瘤、热带痉挛性截瘫以及其他具有相关性的脊髓病等;Ⅱ型与 T-多毛细胞/巨粒细胞白血病等疾病相关，两类病毒都会对人体健康造成严重损害。人类嗜 T 淋巴细胞病毒属于逆转录病毒，还能以前病毒的形式存在于人类染色体上。为此，本公司开发了简单快捷的人类嗜 T 淋巴细胞病毒前病毒染料法荧光定量 PCR 检测试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供病毒样品。
2. 根据人类嗜 T 淋巴细胞病毒前病毒通用保守序列设计的专一性引物，与相关病毒无交叉反应。
3. 灵敏度可以达到几百拷贝/反应。
4. 一管式荧光定量 PCR 检测，避免后续污染。
5. 本试剂盒足够 50 次 20μL 反应体系的荧光定量 PCR。

规格及成分:

编号	成分	规格
试剂一	2×qPCR MagicMix	500 μL（棕色管）
试剂二	荧光 PCR 专用模板稀释液	1 mL（黄盖）
试剂三	人类嗜 T 淋巴细胞病毒前病毒通用染料法 PCR 引物混合液	100 μL（白盖）

试剂四	人类嗜 T 淋巴细胞病毒前病毒通用染料法 PCR 阳性对照(1×10E8 拷贝/μL)	50 μL（红盖）
试剂五	DNA 病毒裂解液（试用装）	15 次（9 mL）
	使用手册	1 份

运输及保存:

低温运输、-20℃保存，有效期一年。

自备试剂:

DNA 模板、10×ROX（根据机型决定，具体见使用方法）。

使用方法:

一、稀释 PCR 阳性对照（以 10E2-10E7 拷贝/μL 这6 个 10 倍稀释度为例）：

1. 注意：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，只提供可以直接使用的 DNA 片段作为阳性对照。

2. 标记 6 个离心管，分别为 7，6，5，4，3，2。

3. 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）。

4. 在 7 号管中加入 5 μL 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照，充分震荡 1 分钟，得 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。

5. 换枪头，在 6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。

6. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照到 5 号管中，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。

7. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备:

8. 如果有 N 个样品，必须设置 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 上步制备的 PCR 阳性对照的第 4 号（浓度为 1×10E4 拷贝/μL，10μL 相当于 1 万拷贝）或第 5 号（浓度为 1×10E5 拷贝/μL，10μL 相当于 10 万拷贝）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。如果每次制备需要 200μL 样品，则 PC 和 NC 的体积也必须是 200μL。

9. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的一管式病毒 DNAout 或其升级版柱式病毒 DNAout。本试剂盒免费赠送 15 次一管式病毒 DNAout。

三、设置 qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）：

10. 如果只做 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，6 个用于 PCR 阳性对照。如果做 2-3 次重复，则反应设置数量相应增加 2 或 3 倍。

11. 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	PCR 阴性 对照管	PCR 阳性对照管 (2-7 管)
2×qPCR MagicMix (棕色管)	10μL	10 μL	各 10 μL
人类嗜T淋巴细胞病毒前病毒通用 PCR 引物混合液（白盖）	2 μL	2 μL	各 2 μL
自备 10×ROX (见注)	2 μL	2 μL	各 2 μL
N+2 待测样品 DNA 模板	6 μL	不加	不加
第 7 步所得 PCR 阳性对照稀释液（2-7 号）	不加	不加	各 6μL（2 号样到 2 号管，3 号样到 3 号管…）

注: 仅 ABI7500、7700 和 7900 仪器需要使用 ROX 作为对照，其他荧光 PCR 仪器（如 iCycler IQ、MJ Option、MJ Chromo4、MX3000、MX4000、RotorGene3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480）不需要使用 ROX，则用水替代。

12. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR（具体 PCR 参数可以根据仪器不同而自行优化）。

过程	温度	时间
预变性	92℃	5 分钟
PCR 反应 30 个循环	94℃	60 秒
	50℃	60 秒
	72℃	60 秒

13. 数据采集

具体操作按所用仪器推荐的流程进行。本产品中所含的荧光染料在不结合 DNA 时，最大吸收光谱在 471 nm，结合 DNA 时的最大吸收光谱在 500 nm，最大发射光谱在 530 nm。信号采集可以设置在复性或延伸步骤。

四、数据处理:

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。

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 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。

所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。