

# 猴 D 型逆转录病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒

## Simian Type-D Retrovirus Probe qRT-PCR Kit

**目录号: ml108184**

# 使 用 说 明 书

### 产品及特点

猴 D 型逆转录病毒(Simian Type-D Retrovirus, SRV)是一种单链 RNA 病毒,其基因组长度为 8393 nt, 属于逆转录病毒科、肿瘤病毒亚科。SRV 是猴获得性免疫缺陷综合征即猴艾滋病的主要病原体之一, 感染的宿主主要是猕猴属的动物, 如恒河猴、食蟹猴和豚尾猴等。SRV 在猴群中往往会引起较高的致病率和死亡率, 给灵长类动物的健康带来极大威胁。因此快速灵敏诊断猴 D 型逆转录病毒具有重要意义。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猴 D 型逆转录病毒的含内参试剂盒, **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, 分析灵敏性高, 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 假阴性样本。

5. 特异性高，靶分子的引物和探针是根据猴 D 型逆转录病毒 RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
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 个数量级。
7. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 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

| 成分                                                                                         | 规格          | 包装        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------|
| 探针法 qRT-PCR 缓冲液                                                                            | 500 $\mu$ L | 0.5mL 蓝盖管 |
| 探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2                                                                        | 50 $\mu$ L  | 0.5mL 红盖管 |
| 荧光 PCR 专用模板稀释液                                                                             | 1mL         | 1.5mL 绿盖管 |
| 猴 D 型逆转录病毒 RT-PCR<br>引物-探针干粉（含内参引物探针）                                                      | 50 次        | 0.5mL 棕色管 |
| 猴 D 型逆转录病毒 RT-PCR 阳性对照(1E7 拷贝/ $\mu$ L)                                                    | 50 $\mu$ L  | 0.5mL 黄色管 |
| 使用手册                                                                                       | 1 份         | 无         |
| 本产品使用五孔盒包装                                                                                 |             |           |
| <b>注意：</b> 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 216 $\mu$ L 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20 $^{\circ}$ C 保存。 |             |           |

## 使用方法

- 一、稀释标准曲线样品**（以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/ $\mu$ L 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 $\mu$ L 荧光 PCR 专用模板稀释液。
3. 在 6 号管中加入 5  $\mu$ L 1E7 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5  $\mu$ L 1E6 拷贝/ $\mu$ L 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阳性样品。放冰上待用。

## 二、样品 RNA 的制备

7. 如果有 N 个样品，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。

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 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）：

| 成分                                   | 样品管<br>N+2 个 | RT-PCR<br>阴性对照 | 标准曲线样品管<br>(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 v2                  | 各 1μL        | 1μL            | 1μL                |
| 猴 D 型逆转录病毒 PCR<br>引物-探针混合液(含内参引物和探针) | 各 4μL        | 4μL            | 4μL                |

|                                  |             |           |             |
|----------------------------------|-------------|-----------|-------------|
| N+2 个待测样 (含内源性内参)                | 各 5 $\mu$ L | 不加        | 不加          |
| 超纯水                              | 不加          | 5 $\mu$ L | 不加          |
| 第 6 步所得标准曲线样品稀释液<br>(含内参, 1-6 号) | 不加          | 不加        | 各 5 $\mu$ L |

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°C | 10min                                       |
| 预变性                   | 95°C | 4min                                        |
| RT-PCR 反应<br>(40 个循环) | 95°C | 15sec                                       |
|                       | 60°C | 45 sec (采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号, 淬灭基团均为 BHQ) |

#### 四、数据处理

12. 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。

13. 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。

14. 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 Cy5 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。

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              | <p><b>15.</b> 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 Cy5 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，<math>r^2</math> 必须大于 0.95，内参 Cy5 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。</p> <p><b>16.</b> 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 Cy5 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。</p> |
| <b>自备试剂</b>  | 样品 RNA。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>运输及保存</b> | 低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |