人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

官方 Q Q：　2881498548

官方网址：www.tw-reagent.com

监督电话：021-54845833

产品及特点：

人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型（Human T-lymphotropic Virus 1 HTLV1）是一种感染后可导致血癌或其他转移癌的 RNA 病毒，在体内主要感染 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，tropicalspastic paraparesis TSP）及色素层炎（uveitis），主要通过输血、针头、性行为、母子传染。HTLV-I 病毒是艾滋病毒（HIV-I）的远亲，但 HTLV-I 和艾滋病的发生没有任何关连。目前各捐血中心以酵素免疫法全面筛检 HTLV-I 病毒。本产品就是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型探针法荧光定量 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，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，引物是根据人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型高度保守区设计，不会跟其他病毒的 RNA 发生交叉反应。

5. 本产品足够 50 次 20μL 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 μL（蓝盖）
试剂二	探针法 qRT-PCR 酶混合液	100 μL（红盖）
试剂三	荧光 PCR 专用模板稀释液	1 mL（黄盖）
试剂四	人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型探针法 qRT-PCR 引物混合液	100 μL（白盖）
试剂五	人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 qRT-PCR 探针	50 μL（棕色管）

试剂六	人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型探针法 qRT-PCR 阳性对照 (1×10E8 /μL)	50 μL（黄盖）
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：

样品 RNA。

使用方法：

一、稀释标准曲线样品（以 10E2-10E7 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 7，6，5，4，3，2。
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 7 号管中加入 5 μL 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E7 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 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 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 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 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（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 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 N+2 个	RT-PCR 阴性对照管	标准曲线样品管 2-7 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	各 2 μL	2 μL	各 2 μL
人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型 qRT-PCR 探针	各 1 μL	1 μL	各 1 μL
人类嗜 T 淋巴细胞病毒 1 型探针 qRT-PCR 引物混合液	各 2 μL	2 μL	各 2 μL
待测样品 RNA 模板	各 5 μL	--	--
超纯水	--	5 μL	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 2-7 号	不加	不加	各5 μL (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℃	30 min
预变性	94℃	10 min
qRT-PCR 反应 35 个循环	94℃	15 sec
	60℃	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。

五、特别提示：

本公司的所有产品，仅可用于科研实验，严禁用于临床医疗及其他非科研用途！