天净沙系列

CAT#:14-22900

低温运输，-20℃保存

天净沙

人免疫缺陷病毒 I 型染料法 qRT-PCR 试剂盒

Human Immunodeficiency Virus 1 SYBR qRT-PCR Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

人免疫缺陷病毒 I 型（Human Immunodeficiency Virus 1，HIV-1）是引起艾滋病的病原体，属于逆转录病毒科慢病毒亚科，为单股正链 RNA 病毒，基因组约为 9.7 kb。人免疫缺陷病毒主要分人免疫缺陷病毒 I 型和人免疫缺陷病毒 II 型两种亚型，人免疫缺陷病毒 I 型在全世界流行，是严重危害人类身体健康和生命的病毒性传染病的病原体，也是全球社会主要的公共卫生问题。因此，快速检测人免疫缺陷病毒 I 型具有重要的意义。为此，本公司以染料法 qRT-PCR 技术为基础开发了人免疫缺陷病毒 I 型的检测试剂盒，它具有下列特点：

1. 一站式，用户不需要单独准备每种成分，只需要提供 RNA 样品。
2. 基于染料法 qRT-PCR 检测，灵敏度比常规 RT-PCR 高 10-100 倍，可以达到 100 拷贝/反应。
3. 根据人免疫缺陷病毒 I 型的保守序列设计引物，具有良好的特异性，不会跟其它生物的 RNA 发生交叉反应。
4. 使用一管式 qRT-PCR 技术，RT 和 PCR 两步在一管内完成，不需要中间转移样品，降低了操作误差和可能的污染。
5. 本产品可用于定性检测，也可用于定量检测。定量检测时线性范围至少有 5 个数量级。
6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的 RT-PCR 反应。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×SYBR qRT-PCR 缓冲液	990102a	500 μL	0.5 mL 本色管
SYBR qRT-PCR 酶混合液 v2	990102bv2	50 μL	0.5 mL 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
人免疫缺陷病毒 I 型 qRT-PCR 引物干粉	yw13-22900-1	50 次	0.5 mL 白盖管
人免疫缺陷病毒 I 型 qRT-PCR 阳性对照（1E7 拷贝/μL）	pc22900-AF033819-gag	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	14-22900sc	1 份	无

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 110 μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。阳性对照需要单独放置。

自备试剂

样品 RNA

使用方法

一、稀释阳性对照（以 1E1-1E6 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。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原。

1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。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。
2. 换枪头，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 1min，得 1E6 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。
3. 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 1min，得 1E5 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。
4. 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 1min，得 1E4 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。
5. 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 RNA 的制备

6. 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 10 μL 上步制备的阳性对照梯度稀释液中的第 4 号（浓度为 1E4 拷贝/μL，10 μL 相当于 1 万拷贝）再加上一定量的水作为制备的阳性对照，加水后其总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样品体积一样。可以用水作为核酸制备的阴性对照 NC。
7. 用自选方法纯化 N+2 个样品的 RNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒样品 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、设置 RT-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 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 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。
9. 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，阳性对照样品要等所有管子盖上盖子后最后加）：

成分	N+2 个 制备所得样品	RT-PCR 阴性对照	RT-PCR 阳性对照（1-6 管）
2×SYBR qRT-PCR 缓冲液	10 μL	10 μL	各 10 μL
人免疫缺陷病毒 I 型 qRT-PCR 引物混合物	2 μL	2 μL	各 2 μL

N+2 个 RNA 模板	7 μL	不加	不加
自备超纯水	不加	7 μL	不加
6 个阳性对照稀释液	不加	不加	各 7 μL（2 号样到 2 号管，3 号样到 3 号管…）
SYBR qRT-PCR 酶混合液 v2	1 μL	1 μL	1 μL

10. 上机后按下面参数进行 RT-PCR（参数可能会因仪器不同而需优化）。

过程	温度	时间
RT（逆转录）	50℃	10 min
预变性	95℃	5 min
RT-PCR 反应（35 个循环）	95℃	15 sec
	58℃	15 sec
	72℃	30 sec （采集 SYBR 通道的荧光信号）
按仪器预设程序进行溶解曲线分析		

注意：循环次数最好不要超过 35 次。

注：部分（如：伯乐 CFX96）机型如果三步法效果不理想可采用两步法：50℃ 10 分钟，95℃ 5 分钟，（95℃ 15 秒、60℃ 60 秒）循环 35 次，每个循环第二步采集荧光信号。

四、数据处理

11. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有 Ct 值，但 Tm 值跟阳性对照 Tm 不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，数据无效，不予以分析。Tm 跟阳性对照 Tm 一致的，为有效 Ct。
12. 如果两种阴性对照的溶解曲线所得 Tm 值跟阳性对照的 Tm 值一样，说明环境或试剂可能有过去的 qRT-PCR 扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。
13. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 qRT-PCR 阴性对照）是假阳性，可以继续分析其它样品有效数据。
14. 对定量检测，以阳性对照样品的浓度的 log 值为横轴，以有效 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效 Ct 值从标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的 log 值，再换算出待测样品的 RNA 浓度。
15. 对定性检测，则有有效 Ct 值的为阳性，无有效 Ct 值的为阴性。

关联产品	人免疫缺陷病毒 I 型可视化染料-荧光染料 RT-LAMP 试剂盒