

【产品名称】

通用名称：人类嗜T淋巴细胞病毒(HTLV) 1型&2型双重探针法荧光定量 RT-PCR试剂盒

【产品编号】 PR63292

【包装规格】 50T/盒

【检验原理】

人类嗜T淋巴细胞病毒（Human T-cell Lymphoma Virus, HTLV）属反转录病毒，含有RNA和反转录酶，是致瘤性RNA病毒，可分为HTLV1型&HTLV2型。本试剂盒可在一次反应中快速检测两种病毒：HTLV1&HTLV2。根据探针法荧光定量RT-PCR原理开发。

它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供核酸（含DNA和RNA）模板。
2. 提供两种病毒的阳性对照，便于区分假阴性样品。
3. 反应快速，灵敏度高。
4. 对所有单个病原体的高灵敏度和强特异性。
5. 可用于高通量检测。
6. 本试剂盒足够做25 μ L体系的探针法荧光定量PCR 50次，只能用于科研。

【试剂组成】

名 称	规 格
2 × OneStep Probe Mix	650 μ L×1管
OneStep Probe Enzyme Mix	55 μ L×1管
DEPC-H ₂ O	1 mL×1 管
荧光模板稀释液	1 mL×1 管
HTLV1& HTLV2 双重 RT-qPCR引物-探针混合液	160 μ L×1 管
HTLV1& HTLV2 双重 RT-qPCR 阳性对照(1×10E8 拷贝/ μ L)	50 μ L ×1 管

说明：不同批号的试剂盒组分不可交互使用。

【储存条件及有效期】

1. 避光-20°C储存，有效期12个月。
2. 低温运输，运输不超过4天；开封后避光-20°C储存对有效期没有影响；避免反复冻融，冻融6次不影响检测结果。
3. 阳性对照需要单独放置，不要污染其他试剂。
4. 生产日期、有效期至：见外包装盒。

【适用仪器】

ABI、安捷伦MX3000P/3005P、LightCycler、Bio-Rad、Eppendorf等系列荧光定量PCR检测仪。

【使用方法】

一、核酸提取(样本制备区)

用自选方法提取纯化样品核酸，本试剂盒跟市场上大多数核酸提取试剂盒兼容。病毒 DNA/RNA 提取试剂盒（吸附柱法）提取核酸。

二、稀释标准曲线样品(样本制备区)

（由于阳性对照浓度高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，避免污染样品或本试剂盒的其他成分）。

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 1×10^8 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^7 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 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^6 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 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 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。若无需制作标准曲线，将阳性对照稀释到 1×10^5 拷贝/ μL 即可。

三、试剂配制(试剂准备区)

准备足量的 qPCR 管（样品管、阴性对照管、阳性对照管），向各 qPCR 管中分别加入下列成分：

成分	N个 待检样品 管	qPCR 阴性对照	qPCR 阳性对照
2 × OneStep Probe Mix	各 12.5 μL	12.5 μL	12.5 μL
OneStep Probe Enzyme Mix	各 1 μL	1 μL	1 μL
HTLV1& HTLV2 双重 RT-qPCR引 物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	3 μL
DEPC-H ₂ O	各 6.5 μL	6.5 μL	6.5 μL

转移至模版添加区。

• 添加模板(模板添加区)

向 qPCR 管中分别加入 2 μL 模板，顺序为阴性对照（DEPC-H₂O）、待测样品模板、HTLV1& HTLV2 双重 RT-qPCR 阳性对照，离心 30 秒，立即进行扩增反应。

• 扩增反应(扩增及产物分析区)

将 qPCR 管放置在 qPCR 扩增仪器样品槽相应位置，进行扩增，扩增程序如下：

过程	温度	时间
反转录	50°C	15 min
预变性	95°C	3min
qPCR 反应 (40 个循环)	95°C	15 sec
	60°C	20 sec
信号通道	同时选择 FAM/Cy5 通道采集荧光信号	

荧光基团和淬灭基团选择如下表：

Target	荧光基团	淬灭基团
HTLV1	FAM	BHQ1
HTLV2	Cy5	BHQ3

六、结果分析

1. 如果制作标准曲线，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，推算出其浓度。

2. 如果无需制作标准曲线，按照如下标准判定结果：

阳性对照（ 1×10^5 拷贝/ μL ）结果：Ct 值 < 30，有明显指数增长，呈典型的 S 型曲线。

阴性对照结果：Ct 值 > 38 或无 Ct 值，无明显指数增长期和平台期。

样本检测结果：Ct 值 < 35，有明显指数增长，表明样本中检测出该病毒，结果为阳性；Ct 值 > 38 或无 Ct 值，表明样本中未检测出该病毒，结果为阴性；Ct 值在 35-38 范围，应对样本进行复检，如重复实验结果 Ct 值仍在 35-38 范围，有明显指数增长，则判定为阳性，否则为阴性。

七、【注意事项】

1. PCR 操作各阶段应严格分区操作，避免交叉污染。
 2. 各组分不得与其他产品或不同批号的相应成分进行互换。
 3. 待测标本若不及时检测，应保存于 -20°C 或 -70°C 。
 4. 样品的处理应该严格按照生物安全规范操作。
 5. PCR 操作人员应具有经验和受过专业培训。
 6. 本试剂盒仅用于科研使用，不做为临床诊断使用。
-

