

人类内源性逆转录病毒 R 家族探针法 qRT-LAMP 试剂盒

Human Endogenous Retroviruses R family Probe qRT-LAMP Kitt

目录号: ml107952

使 用 说 明 书

产品及特点

人类内源性逆转录病毒 (Human Endogenous Retroviruses, HERV) 是人类基因组中的一部分, 它们源自于灵长类动物进化历程中遭遇的外源性逆转录病毒。这些古老的病毒序列约占人类基因组的 8%。在这些人类内源性逆转录病毒中, 人类内源性逆转录病毒 R 家族 (Human Endogenous Retroviruses R family, HERV-R) 尤为典型, 它们在人类基因组中留下了约 50 个不同的拷贝。研究表明, 人类内源性逆转录病毒 R 家族序列在特定人体组织中显示出较高的 RNA 表达水平, 特别是在那些依赖激素的器官和细胞、具有融合功能的组织, 以及那些与外界环境直接接触的组织中。这些发现揭示了人类内源性逆转录病毒 R 家族在人类生物学中的潜在作用, 尤其是在生殖、免疫反应和神经系统功能等方面, 因此快速灵敏诊断 IPNV 具有重要意义。为此本公司根据探针法 qRT-LAMP 技术, 开发了简单快捷的人类内源性逆转录病毒 R 家族 qRT-LAMP 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 RNA 样品。
2. 恒温扩增，反应设置更加简单。
3. 含荧光探针，可以对扩增进行实时荧光检测（需要荧光 PCR 仪）。
4. 检测灵敏性一般比 RT-PCR 高 10 倍以上。
5. 特异性高，引物是根据人类内源性逆转录病毒 R 家族 RNA 保守序列设计的，不会跟其他型别埃柯病毒及其他生物的 RNA 发生交叉反应。
6. 一般 30 分钟内出结果，比 qRT-PCR 快。
7. 提供无传染性的阳性对照，便于分析实验结果。
8. 上样量大，对 20 μ L 的反应体系，样品加样量高达 14 μ L。
9. 内含的 dUTP-UNG 可防交叉污染。
10. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法 qRT-LAMP 扩增。
11. 本产品只可用于科研。

规格及成分

成分	规格	包装
RT-LAMP MasterMix (探针法待加酶)	200 μ L	0.5mL 本色盖
逆转录酶-扩增酶混合液	100 μ L	0.5mL 红盖管
20 \times 人类内源性逆转录病毒 R 家族探针法 qRT-LAMP 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 白盖管
人类内源性逆转录病毒 R 家族阳性对照 (1E7 拷贝/ μ L)	250 μ L	0.5mL 黄盖管
超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管
使用手册	1 份	无
本产品采购五孔盒包装		

	<p>注意：引物干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 55 μL 的超纯水充分混匀和再使用，未用完的需要-20°C保存。</p>
<p>使用方法</p>	<p>一、稀释标准曲线样品 (以 $10\text{E}1$-$10\text{E}6$ 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 RNA 片段作为阳性对照。如果需要 RNA 阳性样品，需要另外订购。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 标记 6 个离心管，分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。 2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头，下同)。 3. 在 6 号管中加入 5 μL $1\text{E}7$ 拷贝/mL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 $1\text{E}6$ 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。 4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL $1\text{E}6$ 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1\text{E}5$ 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 $1\text{E}5$ 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1\text{E}4$ 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。 <p>二、样品 RNA 的制备</p> <ol style="list-style-type: none"> 7. 用自选方法纯化样品 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容，包括本公司的免提取的核酸释放剂。 8. 如果有 N 个样品，则需要做 $N+2$ 个样品制备，包括一个样品制备阳性对照 (PC) 和一个样品制备阴性对照 (NC)。PC 用 10 μL 本试剂盒提供的阳性对照 ($1\text{E}7$ 拷贝/μL) 加一定量的水充当，总体积必须核酸纯化试剂盒所要求的起始样品体积一样，NC 用水替代。 <p>三、探针法 qRT-LAMP 反应 (20μL 体系)</p>

9. 注意：第一次使用一个新的试剂盒时，必须先将 100 μ L 逆转录酶-扩增酶混合液全部加入到 qRT-LAMP MasterMix（探针法，待加酶）中，盖上盖子后轻柔颠倒 1 分钟混匀，然后再取用。如果只做 1 次重复，则标记 N+9 个 RT-LAMP 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-LAMP 阴性对照（用水做模板），6 个用于标准曲线。

10. 反应设置：如果有 N+2 个 RNA 纯化样品，则设置 N+4 个 qRT-LAMP 扩增，增加 qRT-LAMP 阴性对照和 qRT-LAMP 阳性对照各 1 个。在 N+4 个 qRT-LAMP 个管中加入下列成分：

成分	N+2 个 样品管	qRT-LAMP 阴性对照	qRT-LAMP 阳性对照
qRT-LAMP MasterMix（探针法，加酶后）	各 6 μ L	6 μ L	6 μ L
20 \times 人类内源性逆转录病毒 R 家族 探针法 qRT-LAMP 引物-探针混合液	各 1 μ L	1 μ L	1 μ L
N+2 个样品 RNA	各 13 μ L	-	-
超纯水	-	13 μ L	-
人类内源性逆转录病毒 R 家族 qRT-LAMP 阳性 对照（1E7 拷贝/ μ L）	-	-	13 μ L

11. 本产品必须使用荧光 PCR 仪器进行扩增。设置 60 次循环，每次循环 65 $^{\circ}$ C 保温 1 分钟，采集 FAM 通道的荧光信号。

四. 结果分析

12. 若只判断阳性或阴性，则阴性对照 Ct 值必须没有读数，或者大于或等于 40。样品制备阳性对照和 qRT-LAMP 阳性对照必须有荧光对数增长，有标准的 S 扩增曲线，Ct 值应该小于 40。样品制备阴性对照和 qRT-LAMP 阴性对照 Ct 值必须没有读数、大于或等于 40，如果小于 40 则为阳性。

13. 如果阳性和阴性对照结果正常，则实验有效，可以分析样品的情况。

若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。
自备试剂	待测样品。
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。