

鸭乙型肝炎病毒 cccDNA 探针法荧光定量 PCR 试剂盒

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

咨询 QQ : [2881498726](https://www.qq.com)

订购热线 : [021 - 54720761](tel:021-54720761)

咨询电话 : [13166274233\(微信同号\)](https://www.weixin.com)

产品及特点:

乙型肝炎病毒 (HBV) 共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) 是乙肝病毒前基因组 RNA 复制的原始模板, 虽含量较少, 每个肝细胞内只有约 5-50 个拷贝, 但对乙肝病毒的复制以及感染状态的建立具有十分重要的意义, 只有清除了 cccDNA, 才能彻底消除乙肝病毒携带状态。因此快速灵敏检测鸭乙型肝炎病毒 cccDNA 具有重要意义。本产品就是为此目的根据 PCR 原理开发的试剂盒。

1. 即开即用, 用户只需要提供样品 DNA 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, 引物是根据鸭乙型肝炎病毒 cccDNA 高度保守区设计, 不会跟其他病毒 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。

规格及成分:

编号	成分	规格
试剂一	2 \times Probe qPCR MagicMix	500 μ L (本色盖)
试剂三	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL (黄盖)
试剂二	鸭乙型肝炎病毒 cccDNA 探针法 qPCR 引物混合液	100 μ L (白盖)
试剂四	鸭乙型肝炎病毒 cccDNA 探针法 qPCR 探针	50 μ L (棕色管)

试剂五	鸭乙型肝炎病毒 cccDNA 探针法 qPCR 阳性对照 ($1 \times 10^8/\mu\text{L}$)	50 μL (红盖)
	使用手册	1 份

运输及保存:

低温运输, -20°C 保存, 保存期限为 12 个月。

自备试剂:

样品 DNA。

使用方法:

一、稀释标准曲线样品 (以 10^2 - 10^7 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 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 1×10^8 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。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 DNA 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 10 μ L 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 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容。

三、Probe qPCR 反应 (20 μ L 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	N+2 个 样品管	PCR 阴性 对照管	标准曲线 样品管 (2-7 管)
2 \times Probe qPCR MagicMix	10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
鸭乙型肝炎病毒 cccDNA 探针法 qPCR 探针	1 μ L	1 μ L	各 1 μ L
鸭乙型肝炎病毒 cccDNA 探针法 qPCR 引物混合液	2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
N+2 个待测 DNA 模板	7 μ L	--	--
超纯水	--	7 μ L	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)	--	--	各 7 μ L (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 PCR：

过程	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}$ C	3 min
PCR 反应 40 个循环	95 $^{\circ}$ C	15 sec
	60 $^{\circ}$ C	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 C_t 值为纵轴, 绘制标准曲线。再以待测样品的 C_t 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 C_t 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, C_t 值应该小于或等于 30。对待测样品, 如果其 C_t 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。若重复结果 C_t 值小于 40, 扩增曲线有明显起峰, 该样本判断为阳性, 否则为阴性。

所有产品仅供科研使用, 不得用于其他用途。