



荧光 PCR 乙型肝炎病毒定量诊断试剂盒

PCR-Fluorescence Quantity Diagnostic Kit for Hepatitis B Virus
使用说明书

【前言】

本试剂盒采用聚合酶链式反应 (PCR) 结合 Taqman 荧光探针技术，对血清中的乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus) 的特异性 DNA 核酸片段进行定量的检测，本品对 HBV 的检测灵敏度为 500copy/ml (供研究使用)。

【规格】 20 人份，-20℃ 保存，有效期 6 个月

【试剂盒组成】

1	核酸提取液	600ul	5	阴性对照 (HBV)	10ul
			6	HBV 定量阳性对照 1 号 1.0×10^6 copy/ml	10ul
3	HBVPCR 反应液	480 μ l	7	HBV 定量阳性对照 2 号 1.0×10^5 copy/ml	10ul
4	混合酶	40 μ l	8	HBV 定量阳性对照 3 号 1.0×10^4 copy/ml	10ul

【适用仪器】

本试剂盒适用于 PE5700、7700、LightCycler、FTC-2000 等荧光 PCR 仪。

【标本处理和加样】

血清标本各取 30 μ l (冻存血清使用前在室温融解，振荡混匀 10 秒钟)，加入 30ul 核酸提取液，振荡混匀 10 秒种，100℃沸水浴 10 分钟，然后 12,000rpm 离心 5 分钟，最后取上清作 PCR 扩增。处理后的样品应在 1 小时内使用，或在 -20℃ ~ -80℃ 最长保存 1 个月 (不宜反复冻融)。注：定量阳性对照、阴性对照不要处理，可直接使用。

【试剂准备】

按样品数 (样品数 = 血清标本数 + 对照品数 + 定量阳性对照 3 个) n 取 HBV PCR 反应液 n \times 24ul、混合酶 n \times 2ul 混于一离心管中，旋涡振荡器上振荡混匀 10 秒，按每管 26ul 分装于反应管中。将上述处理好的标本上清液和定量阳性对照 1 至 3 号 (务必振荡混匀数秒) 各取 4ul 分别加入反应管中，混匀，低速离心数秒，立即进行 PCR 扩增反应。

【PCR 扩增】

PE5700、7700、icycler、FTC2000 荧光仪的程序设置先在 37℃ 反应 2 分钟，然后 93℃ 保温 5 分钟，再按 93℃ 30 秒 \rightarrow 60℃ 60 秒 循环 40 次。

● lightcycler 荧光仪的程序设置



反应管置于 LightCycler 自动荧光 PCR 仪上，37℃反应 2 分钟，93℃2 分钟，再按 93℃5 秒→60℃30 秒 循环 40 次，每个循环的升降温速率为 20℃/S，每个循环在 60℃30 秒处进行荧光检测设置。

【结果分析与判断】

1、基线设定

1.1 PE5700、7700、FTC2000:

分析前把参比荧光定为TAMRA，如果没有Ct<16的强阳性标本，就选 3-15 个循环的平均荧光信号为基线分析；如果有Ct<16的强阳性标本，就将此标本定为HBV DNA>10¹⁰ copy/ml，并将此样品从数据库中剔除，再以 3-15 个循环的平均荧光信号为基线再分析Ct。

1.2 iCycler

基线一般按照自设值（2-10）即可，在实验结束后，选择PCR baseline subtract选项扣除基线值。若某些曲线出现了规则的剧烈的跳动，应视为非正常情况，将其从结果中剔除（击活 select wells，将此孔彩色点去，然后选择display wells）并注意调整坐标，使所有曲线都在坐标以内。

1.3 lightcycler

用荧光记数值 F1/F2 读取结果。基线设定原则以超过正常阴性对照扩增曲线的最高点，且 Ct 值不出现任何数值为准（一般在 0.001-0.05 范围内）。

2、阈值设定

以刚好高于阴性对照品的扩增曲线最高点，且阴性对照品 Ct=40 或 0 为原则，调整起始阈值。

3、结果分析

3.1 Ct<16 的强阳性标本，报告为HBV DNA>10¹⁰ copy/ml。

3.2 38>Ct>16 的标本，按参比曲线计算浓度报告。

3.3 当 Ct=40 或 0 时，报告为阴性。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市吴河路328号A座2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：021-54460832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

