

上海通尉

TW—reagent.com 上海通尉

单纯疱疹病毒探针法 qPCR 试剂盒

Herpes Simplex Virus Probe PCR Kit

仅

供

科

研

使

用

产品及特点

单纯疱疹病毒 (Herpes Simplex Virus, HSV) 是圆形病毒, 具有双链线性的 DNA, 全长约 125—240kb。根据单纯疱疹病毒抗原性质的不同分为两个亚型: 即 HSV- I 和 HSV- II。HSV- I 主要侵犯面、脑及腰以上部位, HSV- II 主要侵犯生殖器及腰以下部位。正常人可作为病毒携带者。人是单纯疱疹病毒惟一的自然宿主, 70%~90%的成人皆曾感染过 HSV- I。病毒经过口腔、呼吸道、生殖器以及皮肤破损处侵入体内, 潜居于人体正常黏膜、血液、唾液、神经组织及多数器官内。单纯疱疹病毒的流行给人类的生活带来很大的困扰, 因此快速检测单纯疱疹病毒具有重要意义。本产品是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测单纯疱疹病毒的试剂盒, **它具有下列特点:**

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, 分析灵敏性高, 可以达到 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。
4. 特异性高, 引物是根据单纯疱疹病毒 DNA 高度保守区设计, 不会跟其他病毒的 DNA 发生交叉反应。
5. 涵盖性广, 尤其是能检查危害人类健康的几种单纯疱疹病毒。
6. 既可用于定性检测, 又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。
7. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	规格	包装
2 \times Probe qPCR MasterMix	0.5mL	0.5mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管
单纯疱疹病毒 qPCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 棕色管
单纯疱疹病毒 qPCR 阳性对照(1 \times 10 ⁷ 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5mL 黄盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用五孔盒包装		
<p>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 162mL 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20$^{\circ}$C 保存。</p>		

使用方法

一、稀释标准曲线样品 (以 $1E1-1E6$ 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 6, 5, 4, 3, 2, 1。
2. 用带芯枪头分别加入 $45\mu\text{L}$ 荧光 PCR 专用模板稀释液, 好用带芯枪头, (下同)。
3. 在 6 号管中加入 $5\mu\text{L}1\times 10E7$ 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 $1\times 10E6$ 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 $5\mu\text{L}1\times 10E6$ 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 $1\times 10E5$ 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 $5\mu\text{L}1\times 10E5$ 拷贝/ μL 的阳性对照(上步所得), 充分震荡 1 分钟, 得 $1\times 10E4$ 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。

二、样品 DNA 的制备

7. 如果有 N 个样品, 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 $10\mu\text{L}$ 上步所得 4 号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。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA, 本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 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、Probe qPCR 反应 (20 μL 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 (直接用第 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。

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加) :

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10μL	10μL	各 10μL
单纯疱疹病毒 qPCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7μL	不加	不加
超纯水	不加	7μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7μL

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°C	5min
PCR 反应 (45 个循环)	95°C	15sec
	60°C	1min (采集 FAM 通道, 淬灭基团为 TAMRA)

四、数据处理

12. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性, 则整个扩增或制备实验无效, 不需要分析数据, 需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性, 说明环境污染, 则整个扩增或制备实验无效, 不需要分析数据, 需要跟厂家联系, 购买新的引物和探针。

13. 如果阴性对照和阳性对照正常, 则实验有效, 可以进入后续分析。

14. 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 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 DNA 浓度的 log 值, 再推算出其浓度。

	15. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 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，Ct 值应该小于 40，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 40，则为阴性。如果 Ct 小于 40 则为阳性。
PCR 编号	TW-E10541
说明书	1 份
自备试剂	样品 DNA，超纯水，核酸纯化试剂盒。
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 2 年

生产企业: 上海通蔚实业有限公司

公司地址: 上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603

公司电话: 021-54845833

技术支持: 15800441009