

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:14-60800 (原 11-180501)  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

Epstein Barr 病毒染料法荧光定量 PCR 试剂盒  
EB Virus qPCR Kit (Dye based)

使用手册 V2.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

## 产品及特点

EB 病毒 (Epstein-Barr Virus, EBV, EB 病毒) 是疱疹病毒科嗜淋巴细胞病毒属的成员, 基因组为 DNA。EB 病毒具有在体内外专一性地感染人类及某些灵长类 B 细胞的生物学特性。人是 EB 病毒感染的宿主, 主要通过唾液传播。无症状感染多发生在幼儿, 3~5 岁幼儿 90% 以上曾感染 EB 病毒, 90% 以上的成人都有病毒抗体。EB 病毒是传染性单核细胞增多症的病原体, 此外 EB 病毒与鼻咽癌、儿童淋巴瘤的发生有密切相关性, 被列为可能致癌的人类肿瘤病毒之一。本产品就是专门用于快速检测 EBV 的 PCR 试剂盒, 它具有下列特点:

1. 根据 EB 病毒保守区设计的针对 EB 病毒的 PCR 引物, 专一性强。
2. 即开即用, 用户只需要提供样品模板, 操作简单, 定量准确快速。
3. 提供样品对照, 便于制备标准曲线和监控反应。
4. 一管式荧光定量 PCR 检测, 避免后续污染。
5. 本试剂盒足够 50 次 20 $\mu$ L 反应体系的荧光定量 PCR。
6. 本产品只适用于科研, 不能用于临床诊断。

## 要规格及成分

成分	编号	十孔盒包装 (去纸托)
2 $\times$ qPCR MagicMix	90408	0.5 mL (棕色, 装 A 袋)
微量核酸稀释液	121206	1 mL (红盖, 装 A 袋)
EB 病毒 PCR 引物对	14-60800yw	100 $\mu$ L (本色, 装 A 袋)
EB 病毒阳性对照 (1 $\times$ 10E8 拷贝/ $\mu$ L)	14-60800pc	50 $\mu$ L (白盖, 装 B 袋)
DNA 病毒裂解液 (试用装)	3674a	15 次 (9 mL)
使用手册	14-60800sc	1 份

## 运输及保存

低温运输、-20 $^{\circ}$ C 保存(A 袋试剂放样品准备区、最好与 B 袋的阳性对照分开放置), 有效期一年。

## 自备试剂

DNA 模板、10 $\times$ ROX (根据机型决定, 具体见使用方法)。

## 使用方法

### 一、样品 DNA 的制备

1. 用自选方法纯化样品的 DNA, 本试剂盒跟市场上大多数病毒 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的一管式病毒 DNAout 或其升级版柱式病毒 DNAout。本试剂盒免费赠送 15 次 DNA 病毒裂解液 (一管式病毒 DNAout), 其使用手册可以从本公司网站 [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com), 通过搜索产品名称一管式病毒 DNAout 或产品编号 3674 下载。最后得到 200 $\mu$ L 模板 DNA (每个样品) 放冰上待用, 溶解 DNA 沉淀的溶液不能少于 200 $\mu$ L, 否则 PCR 抑制物很可能会抑制 PCR。

二、稀释阳性对照作为制备标准曲线的模板(以 10E2-10E7 这 6 个 10 倍稀释度为例)。

2. 说明：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，只提供可以直接使用的长为 97bp 的 DNA 片段作为阳性对照。
3. 标记 6 个离心管，分别为 7，6，5，4，3，2。
4. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu\text{L}$  微量核酸稀释液（最好用带芯枪头，下同）。注意：微量核酸稀释液使极低浓度的模板稳定，不能用水或 TE 替代。
5. 在 7 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。
6. 换枪头，在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。
7. 换枪头，在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。
8. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。未用完的阳性对照稀释液可以放  $-20^\circ\text{C}$  长期保存，反复使用。

### 三、设置 PCR 反应（40 $\mu\text{L}$ 体系，在样品制备室进行）

9. 在 PCR 管中加入下列成分（待测样品最好做三次重复，下表只列出一）：

成分	样品	阴性对照	阳性对照(2-7 管)
2 $\times$ qPCR MagicMix	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	各 10 $\mu\text{L}$
EB 病毒 PCR 引物对	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	各 2 $\mu\text{L}$
自备 10 $\times$ ROX (见注)	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	各 2 $\mu\text{L}$
DNA 模板	5 $\mu\text{L}$	不加	不加
阳性对照 (2-7 号)	不加	不加	各 5 $\mu\text{L}$ (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管...)
补水到	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$

注:仅 ABI7500、7700 和 7900 仪器需要使用 ROX 作为对照，其他荧光 PCR 仪器（如 iCycler IQ、MJ Option、MJ Chromo4、MX3000、MX4000、RotorGene 3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480）不需要使用 ROX。

10. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR（具体 PCR 参数可以根据仪器不同而自行优化）。

过程	温度	时间
预变性	95 $^\circ\text{C}$	2 分钟

PCR 反应	91℃	15 秒
(45 个循环)	58℃	60 秒

11. 数据采集

具体操作按所用仪器推荐的流程进行，一般在 DNA 聚合步骤采集荧光信号。本产品中所含的荧光染料在不结合 DNA 时，最大吸收光谱在 471 nm，结合 DNA 时的最大吸收光谱在 500 nm，最大发射光谱在 530 nm。

12. 根据所用荧光定量 PCR 仪器的方法进行溶解曲线分析（每种仪器可能稍微有所不同），排除非特异扩增。

**四、数据处理**

13. 以 6 个阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品 Ct 值从标曲上找出其浓度的 log 值，再计算出样品 DNA 的浓度。

**关联产品**

EB 病毒 LAMP 检测试剂盒