

天
净
沙
系
列

CAT#:14-30416
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

HPV-16 型荧光定量 PCR 检测试剂盒(染料法)
HPV-16 qPCR Kit (Dye based)

使用手册 V1.0

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; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点	人乳头瘤病毒（Human papillomavirus，HPV）是一种属于乳多空病毒科的乳头瘤空泡病毒 A 属，是球形 DNA 病毒，能引起人体皮肤黏膜的鳞状上皮增殖。表现为寻常疣、生殖器疣（尖锐湿疣）等症状。随着性病中尖锐湿疣的发病率急速上升和宫颈癌、肛门癌等的增多，人乳头瘤病毒感染越来越引起人们的关注。其中黏膜高危型 HPV-16、18、30、31、33、35、39 与宫颈癌、直肠癌、口腔癌、扁桃体癌等相关，其早期检测非常重要。本产品就是针对此需求而建立的一种定量检测 HPV-16 型病毒的高灵敏的 PCR 检测方法。本试剂盒具有下列特点： 1. 根据 HPV-16 保守区设计的针对 HPV-16 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. 一管式荧光定量 PCR 检测，避免后续污染。 4. 本试剂盒足够 100 次 20uL 反应体系的荧光定量 PCR。 5. 本产品只适用于科研，不能用于临床诊断。																										
要规格及成分	<table><tr><th>成分</th><th>编号</th><th>十孔盒包装（去纸托）</th></tr><tr><td>2×qPCR MagicMix</td><td>90408</td><td>1.0 mL（棕色，装 A 袋）</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>100935</td><td>1 mL（红盖，装 A 袋）</td></tr><tr><td>引物 14-30416F</td><td>14-30416f</td><td>1 OD（本色，装 B 袋）</td></tr><tr><td>引物 14-30416R</td><td>14-30416r</td><td>1 OD（本色，装 B 袋）</td></tr><tr><td>HPV-16 阳性对照 (10E8copy/μL)</td><td>14-30416pc</td><td>50 μL（白盖，装 C 袋）</td></tr><tr><td>DNA 病毒裂解液（试用装）</td><td>3674a</td><td>15 次（9 mL）</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>14-30416sc</td><td>1 份</td></tr></table>			成分	编号	十孔盒包装（去纸托）	2×qPCR MagicMix	90408	1.0 mL（棕色，装 A 袋）	超纯水	100935	1 mL（红盖，装 A 袋）	引物 14-30416F	14-30416f	1 OD（本色，装 B 袋）	引物 14-30416R	14-30416r	1 OD（本色，装 B 袋）	HPV-16 阳性对照 (10E8copy/μL)	14-30416pc	50 μL（白盖，装 C 袋）	DNA 病毒裂解液（试用装）	3674a	15 次（9 mL）	使用手册	14-30416sc	1 份
成分	编号	十孔盒包装（去纸托）																									
2×qPCR MagicMix	90408	1.0 mL（棕色，装 A 袋）																									
超纯水	100935	1 mL（红盖，装 A 袋）																									
引物 14-30416F	14-30416f	1 OD（本色，装 B 袋）																									
引物 14-30416R	14-30416r	1 OD（本色，装 B 袋）																									
HPV-16 阳性对照 (10E8copy/μL)	14-30416pc	50 μL（白盖，装 C 袋）																									
DNA 病毒裂解液（试用装）	3674a	15 次（9 mL）																									
使用手册	14-30416sc	1 份																									
运输及保存	低温运输、-20℃保存(A 袋和 B 袋的试剂放样品准备区、C 袋的阳性对照最好分开放置)，有效期一年。																										
自备试剂	DNA 模板、10×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 病毒裂解液试用装（一管式病毒 DNAout 的成分），其使用手册可以从本公司网站 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。 二、引物的制备（在样品制备室进行） 2. 按引物标签提示在装引物干粉的管中直接加入适量的超纯水（加入量见引物试管上																										

的标签)，使得两条引物的浓度均为 10 μM (10 pmol/μL)，然后各取 50 μL 混合在一起，标注为引物混合物，放冰上待用。

三、稀释阳性对照（以 10E2-10E7 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，只提供可以直接使用的长为 126bp 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 μL 超纯水（最好用带芯枪头，下同）。
5. 先将本试剂盒提供的阳性对照用超纯水 10 倍梯度稀释到 10E8 拷贝/μL。放冰上待用。
6. 在 7 号管中加入 5 μL 10E8 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 10E7 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。
7. 换枪头，在 6 号管中加入 5 μL 10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 10E6 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。
8. 换枪头，从 6 号管中取 5 μL 溶液到 5 号管中，充分震荡 1 分钟，得 10E5 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。
9. 换枪头，从 5 号管中取 5 μL 溶液到 4 号管中，得 10E4 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。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。

三、设置 PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

10. 在 PCR 管中加入下列成分（待测样品需要做三次重复，下表只列出一次。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）：

成分	样品	阴性对照	阳性对照(2-7 管)
2×qPCR Mix	10 μL	10 μL	各 10 μL
引物混合物	2 μL	2 μL	各 2 μL
自备 10×ROX (见注)	2 μL	2 μL	各 2 μL
待测样品 DNA 模板	1-5 μL	不加	不加
阳性对照 (2-7 号)	不加	不加	各 5μL (2 号样到 2 号管,3 号样到 3 号管…)
补水到	20 μL	20 μL	20 μL

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。 11. 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）。 <table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>1 分钟</td></tr><tr><td rowspan="3">PCR 反应 (40 个循环)</td><td>95℃</td><td>15 秒</td></tr><tr><td>60℃</td><td>15 秒</td></tr><tr><td>72℃</td><td>15 秒</td></tr></table> 12. 数据采集 具体操作按所用仪器推荐的流程进行。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。 13. 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 14. 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。再以待测样品浓度的 log 和标准曲线计算出样品 DNA 的浓度。	过程	温度	时间	预变性	95℃	1 分钟	PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15 秒	60℃	15 秒	72℃	15 秒
过程	温度	时间												
预变性	95℃	1 分钟												
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15 秒												
	60℃	15 秒												
	72℃	15 秒												
关联产品	PCR 抑制物清除剂(CAT#:60804)，即用型荧光定量 PCR 试剂盒（CAT#:90408-1）													