

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:14-30418  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

HPV-18 型荧光定量 PCR 检测试剂盒(染料法)  
HPV-18 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](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>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-18 型病毒的高灵敏的 PCR 检测方法。本试剂盒具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 根据 HPV-18 保守区设计的针对 HPV-18 的 PCR 引物, 专一性强。</li> <li>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。</li> <li>3. 一管式荧光定量 PCR 检测, 避免后续污染。</li> <li>4. 本试剂盒足够 100 次 20<math>\mu</math>L 反应体系的荧光定量 PCR。</li> <li>5. 本产品只适用于科研, 不能用于临床诊断。</li> </ol>																										
<p><b>要规格及成分</b></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装 (去纸托)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2<math>\times</math>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 14-30418F</td> <td>14-30418f</td> <td>1 OD (本色, 装 B 袋)</td> </tr> <tr> <td>引物 14-30418R</td> <td>14-30418r</td> <td>1 OD (本色, 装 B 袋)</td> </tr> <tr> <td>HPV-18 阳性对照 (10E8copy/<math>\mu</math>L)</td> <td>14-30418pc</td> <td>50 <math>\mu</math>L (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>14-30418sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	十孔盒包装 (去纸托)	2 $\times$ qPCR MagicMix	90408	1.0 mL (棕色, 装 A 袋)	超纯水	100935	1 mL (红盖, 装 A 袋)	引物 14-30418F	14-30418f	1 OD (本色, 装 B 袋)	引物 14-30418R	14-30418r	1 OD (本色, 装 B 袋)	HPV-18 阳性对照 (10E8copy/ $\mu$ L)	14-30418pc	50 $\mu$ L (白盖, 装 C 袋)	DNA 病毒裂解液 (试用装)	3674a	15 次 (9 mL)	使用手册	14-30418sc	1 份
成分	编号	十孔盒包装 (去纸托)																									
2 $\times$ qPCR MagicMix	90408	1.0 mL (棕色, 装 A 袋)																									
超纯水	100935	1 mL (红盖, 装 A 袋)																									
引物 14-30418F	14-30418f	1 OD (本色, 装 B 袋)																									
引物 14-30418R	14-30418r	1 OD (本色, 装 B 袋)																									
HPV-18 阳性对照 (10E8copy/ $\mu$ L)	14-30418pc	50 $\mu$ L (白盖, 装 C 袋)																									
DNA 病毒裂解液 (试用装)	3674a	15 次 (9 mL)																									
使用手册	14-30418sc	1 份																									
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输、-20<math>^{\circ}</math>C 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。</p>																										
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>DNA 模板、10<math>\times</math>ROX (根据机型决定, 具体见使用方法)。</p>																										
<p><b>使用方法</b></p>	<p><b>一、样品 DNA 的制备</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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 <a href="http://www.tiandz.com">www.tiandz.com</a>, 通过搜索产品名称一管式病毒 DNAout 或产品编号 3674 下载。</li> </ol> <p><b>二、引物的制备 (在样品制备室进行)</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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</li> </ol>																										

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 100bp 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 MagicMix	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）。

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

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。

#### 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)