

天净沙系列

CAT#:14-35700
低温运输，-20℃保存

TIANDZ

腺病毒荧光 PCR 检测试剂盒（染料法）
Adenovirous qPCR Kit

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	<p>人类腺病毒 (<i>Adenovirous</i>) 是一种可广泛引起呼吸道、胃肠道、泌尿系统及眼部等身体多个器官疾病的重要病原体，对人类健康危害较大。腺病毒血清型众多，目前可分为 A-G 7 个亚属，52 个血清型。传统的检测方法包括病毒分离鉴定、免疫荧光和普通 PCR 等。本试剂盒利用实时荧光定量 PCR 技术开发的腺病毒检测试剂盒，通过荧光染料实时显示样品模板 DNA 的量，并通过坐标曲线表示出来，结果直观准确。它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 根据腺病毒 Hexon 基因，设计的针对腺病毒的 PCR 引物，克服了其他病毒的干扰。 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. 荧光定量 PCR 检测，反应特异性强。 4. 本试剂盒足够 100 次 20uL 体系的 qPCR 反应。 5. 本产品只适用于科研，不能用于临床诊断。 																					
规格及成分	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">成分</th><th style="text-align: center;">编号</th><th style="text-align: center;">十孔盒包装(去纸托)</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">2×qPCR Mix</td><td style="text-align: center;">90408</td><td style="text-align: center;">1.0 mL (A 袋包装)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">Hexon 基因专一性引物 A</td><td style="text-align: center;">yw1462</td><td style="text-align: center;">1 OD (A 袋包装)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">Hexon 基因专一性引物 B</td><td style="text-align: center;">yw1463</td><td style="text-align: center;">1 OD (A 袋包装)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">超纯水</td><td style="text-align: center;">100935</td><td style="text-align: center;">1 mL×2 (A 袋包装)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">Hexon 基因阳性对照 (10E9 copy/μL)</td><td style="text-align: center;">yw14641465</td><td style="text-align: center;">50 μL (B 袋包装)</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">使用手册</td><td style="text-align: center;">14-35700sc</td><td style="text-align: center;">1 份</td></tr> </tbody> </table>	成分	编号	十孔盒包装(去纸托)	2×qPCR Mix	90408	1.0 mL (A 袋包装)	Hexon 基因专一性引物 A	yw1462	1 OD (A 袋包装)	Hexon 基因专一性引物 B	yw1463	1 OD (A 袋包装)	超纯水	100935	1 mL×2 (A 袋包装)	Hexon 基因阳性对照 (10E9 copy/μL)	yw14641465	50 μL (B 袋包装)	使用手册	14-35700sc	1 份
成分	编号	十孔盒包装(去纸托)																				
2×qPCR Mix	90408	1.0 mL (A 袋包装)																				
Hexon 基因专一性引物 A	yw1462	1 OD (A 袋包装)																				
Hexon 基因专一性引物 B	yw1463	1 OD (A 袋包装)																				
超纯水	100935	1 mL×2 (A 袋包装)																				
Hexon 基因阳性对照 (10E9 copy/μL)	yw14641465	50 μL (B 袋包装)																				
使用手册	14-35700sc	1 份																				
运输及保存	低温运输、-20℃保存(B 袋的阳性对照一定要放扩增区，A 袋的其余试剂放样品准备区)，有效期一年。																					
自备试剂	DNA 模板。																					
使用方法	<p>一、样品 DNA 的制备</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 用自选方法纯化腺病毒样品的 DNA，也可以另购本公司的柱式病毒 DNAout 或一管式病毒 DNAout，此产品跟本试剂盒兼容。 <p>二、引物的制备（在样品制备室进行）</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 uM (10 pmol/uL)。 <p>三、稀释阳性对照（以 10E3-10E8 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</p>																					

体样品做阳性对照，只提供可以直接使用的长度为 139bp 的 DNA 片段作为阳性对照。

3. 标记 5 个离心管，分别为 8, 7, 6, 5, 4, 3 号。
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. 在 8 号管中加入 5 μL 10E9 拷贝/ μL 的腺病毒 Hexon 基因阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 10E8 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
6. 在 7 号管中加入 5 μL 10E8 拷贝/ μL 的腺病毒 Hexon 基因阳性对照(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. 在 6 号管中加入 5 μL 10E7 拷贝/ μL 的腺病毒 Hexon 基因阳性对照(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，充分震荡 1 分钟，得 10E4 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
10. 换枪头，从 4 号管中取 5 μL 溶液到 3 号管中，充分震荡 1 分钟，得 10E3 拷贝/ μL 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)

11. 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成分盖上盖子储存好后最后加）：

成分	样品	阴性对照	阳性对照(3-8 管)
2 \times qPCR Mix	10 μL	10 μL	各 10 μL
Hexon 基因专一性引物 A, 10 uM	1 μL	1 μL	各 1 μL
Hexon 基因专一性引物 B, 10 uM	1 μL	1 μL	各 1 μL
自备 10 \times 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 (3-8 号)	不加	不加	各 5 μL (3 号样到 3 号管, 4 号样到 4 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。

	<p>12. 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）。</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>预变性</td><td>95°C</td><td>15 分钟</td></tr> <tr> <td rowspan="2">PCR 反应 (40 个循环)</td><td>94°C</td><td>15 秒</td></tr> <tr> <td>52°C</td><td>30 秒</td></tr> <tr> <td></td><td>72°C</td><td>30 秒</td></tr> </tbody> </table> <p>13. 数据采集</p> <p>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。</p> <p>四、数据处理</p> <p>14. 以 Hexon 基因序列阳性对照浓度的 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 为横轴，以 Ct 值为纵轴，通过待测样品的 Ct 值计算出样品 DNA 的浓度。</p>	过程	温度	时间	预变性	95°C	15 分钟	PCR 反应 (40 个循环)	94°C	15 秒	52°C	30 秒		72°C	30 秒
过程	温度	时间													
预变性	95°C	15 分钟													
PCR 反应 (40 个循环)	94°C	15 秒													
	52°C	30 秒													
	72°C	30 秒													
关联产品	即用型荧光定量 PCR 试剂盒 (CAT#:90408-1)														