

天
净
沙
系
列

CAT#:14-64110
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

人单纯疱疹病毒 I 型荧光定量 PCR 检测试剂盒(染料法)
HSV-1 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	单纯疱疹病毒（Herpes Simple Viruses， HSV）属于疱疹病毒科 α 病毒亚科，为双股 DNA 病毒，疱疹病毒感染的宿主范围广泛，可感染人类和其他脊椎动物。对人的感染通过人与人接触传染。根据抗原性的差别目前把 HSV 分为 1 型和 2 型。1 型主要由口唇病灶获得，2 型可从生殖器病灶分离到。从发生后四个月到数年被感染的人数可达人口总数的 50-90%，是最易感染人的一种病毒。因此对 HSV-1 的快速诊断具有重要的意义。本产品就是根据 HSV-1 保守区设计引物而开发的高灵敏荧光定量 PCR 产品。本试剂盒具有下列特点： 1. 根据 HSV-1 的 gD 基因设计的专一性引物，与相关病毒无交叉反应。 2. 灵敏度比常规 PCR 高 2-3 个数量级，可以达到几百拷贝/反应。 3. 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。 4. 一管式荧光定量 PCR 检测，避免后续污染。 5. 本试剂盒足够 100 次 20μL 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。			
规格及成分		成分	编号	十孔盒包装（去纸托）
		2 $\times$ qPCR MagicMix	90408	1 mL（棕色，装 A 袋）
		超纯水	100935	1 mL（红盖，装 A 袋）
		引物 14-64110F	14-64110f	1 OD（本色，装 B 袋）
		引物 14-64110R	14-64110r	1 OD（本色，装 B 袋）
		HSV-1 阳性对照 (1 $\times$ 10E8 copy/ μ L)	14-64110pc	50 μ L（白盖，装 C 袋）
		DNA 病毒裂解液（试用装）	3674a	15 次（9 mL）
		使用手册	14-64110sc	1 份
运输及保存	低温运输、-20 $^{\circ}$ 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。			
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 μ M（10 pmol/ μ L），然后各取 110 μ L 混合在一起得 220 μ L，标注为引物混合物，放冰上待用。220 μ L 足够 100 次 qPCR 反应。

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 52bp 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 μ L 超纯水（最好用带芯枪头，下同）。
5. 在 7 号管中加入 5 μ L 1 $\times$ 10E8 拷贝/ μ L 的阳性对照，充分震荡 1 分钟，得 1 $\times$ 10E7 拷贝/ μ L 的阳性对照。放冰上待用。
6. 换枪头，在 6 号管中加入 5 μ L 1 $\times$ 10E7 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1 $\times$ 10E6 拷贝/ μ L 的阳性对照。放冰上待用。
7. 换枪头，从 6 号管中取 5 μ L 1 $\times$ 10E6 拷贝/ μ L 的阳性对照到 5 号管中，充分震荡 1 分钟，得 1 $\times$ 10E5 拷贝/ μ L 的阳性对照。放冰上待用。
8. 换枪头，从 5 号管中取 5 μ L 1 $\times$ 10E5 拷贝/ μ L 的阳性对照到 4 号管中，得 1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L 的阳性对照。放冰上待用。
9. 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 qPCR 反应（20 μ L 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。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 $\times$ qPCR MagicMix	10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
引物混合物	2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
自备 10 $\times$ ROX (见注)	2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
待测样品 DNA 模板	1-5 μ L	不加	不加
阳性对照（2-7 号）	不加	不加	各 5 μ L（2 号样到 2 号管,3 号样到 3 号管…）
补水到	20 μ L	20 μ L	20 μ 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。 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="2">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>95℃</td><td>15 秒</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60 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。 四、数据处理 13. 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。	过程	温度	时间	预变性	95℃	1 分钟	PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 秒	60℃	60 秒
过程	温度	时间										
预变性	95℃	1 分钟										
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 秒										
	60℃	60 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）											