

天
净
沙
系
列

CAT#:14-64120
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

单纯疱疹病毒 II 型荧光定量 PCR 检测试剂盒(染料法)
HSV- II 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

| <p>产品及特点</p> | <p>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较为广泛, 可感染人与其他脊椎动物, 主要通过接触传染。目前, 根据抗原的不同把 HSV 分为 I 型和 II 型。HSV-II 型的原发感染主要引起生殖器疱疹, 一旦感染, 患者将终身携带这种病毒并周期性地出现生殖器疱疹性损伤, HSV-II 感染还会增加 HSV-II 传播的风险。此外, II 型病毒对田鼠细胞等有转化作用, 同时怀疑疱疹病毒与女性的宫颈癌有关。因此对 HSV-II 型的快速诊断具有重要的意义。本产品就是针对此需求而建立的一种检测 HSV-II 型的 DNA 总含量的、高灵敏的 PCR 检测方法, 根据 HSV-II 型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:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 根据 HSV-II 保守区设计的针对 HSV-II 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 20μL 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。 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|---|------------------------|--|----|----|-------------|--------------------------|-------|--------------------|-----|--------|------------------|--------------|-----------|------------------|--------------|-----------|------------------|------------------------------------|------------|------------------------|-----------------|-------|-------------|------|------------|-----|
| <p>规格及成分</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\timesqPCR 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 14-64120F</td> <td>14-64120f</td> <td>1 OD (本色, 装 B 袋)</td> </tr> <tr> <td>引物 14-64120R</td> <td>14-64120r</td> <td>1 OD (本色, 装 B 袋)</td> </tr> <tr> <td>HSV-II 阳性对照 (10E8copy/μL)</td> <td>14-64120pc</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>14-64120sc</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 14-64120F | 14-64120f | 1 OD (本色, 装 B 袋) | 引物 14-64120R | 14-64120r | 1 OD (本色, 装 B 袋) | HSV-II 阳性对照 (10E8copy/ μ L) | 14-64120pc | 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 | 14-64120sc | 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 14-64120F | 14-64120f | 1 OD (本色, 装 B 袋) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 引物 14-64120R | 14-64120r | 1 OD (本色, 装 B 袋) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HSV-II 阳性对照 (10E8copy/ μ L) | 14-64120pc | 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 | 14-64120sc | 1 份 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>运输及保存</p> | <p>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。</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>自备试剂</p> | <p>DNA 模板、10\timesROX (根据机型决定, 具体见使用方法)。</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>使用方法</p> | <p>一、样品 DNA 的制备</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 75bp 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。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 Mix | 10 μL | 10 μL | 各 10 μL |
| 引物混合物 | 2 μL | 2 μL | 各 2 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 (2-7 号) | 不加 | 不加 | 各 5 μL (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℃ | 10 分钟 |
| PCR 反应 (45 个循环) | 95℃ | 15 秒 |
| | 60℃ | 1 分钟 |

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)