|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:14-60800****低温运输，-20℃保存** |  |
| **EB病毒染料法qPCR试剂盒****EB Virus SYBR qPCR Kit** |
| **使用手册V1.0** |
| **江苏天净沙基因诊断技术有限公司****网址：**[**www.bingene.com**](http://www.bingene.com)**；电话：400-6605850；电邮：order@bingene.com** |
| **产品及特点** | EB病毒（Epstein-Barr Virus，EBV，EB病毒）是疱疹病毒科嗜淋巴细胞病毒属的成员，基因组为DNA。EB病毒具有在体内外专一性地感染人类及某些灵长类B细胞的生物学特性。人是EB病毒感染的宿主，主要通过唾液传播。无症状感染多 发生在幼儿，3～5 岁幼儿 90%以上曾感染EB病毒，90%以上的成人都有病毒抗体。EB病毒是传染性单核细胞增多症的病原体，此外 EB 病毒与鼻咽癌、儿童淋巴瘤的 发生有密切相关性，被列为可能致癌的人类肿瘤病毒之一，因此、快速检测EB病毒具有重要的意义。本公司开发EBV染料法荧光定量PCR试剂盒，它具有下列特点： 1. 即开即用，用户只需要提供样品DNA模板。
2. 引物经过优化，灵敏性高，分析灵敏度可以达到100拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据EB病毒DNA高度保守区设计，不会跟其他生物的DNA发生交叉反应。
5. 本产品足够50次20μL体系的染料法荧光定量PCR反应。
6. 既可用于定性，也可用于定量。用于定量时线性范围至少5个数量级。
7. 本产品只能用于科研。
 |
| **规格及成分** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 成分 | 编号 | 规格 | 包装材料 |
| 2×SYBR qPCR MasterMix | 990408 | 0.5 mL | 0.5mL本色盖 |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 180701 | 1 mL | 1.5mL绿盖管 |
| 超纯水 | 210806 | 1 mL | 1.5mL蓝盖管 |
| EB病毒染料法qPCR引物混合液 | yw14-60800 | 100 μL | 0.5mL白色盖 |
| EB病毒染料法qPCR阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL) | pc60800 | 50 μL | 0.5mL黄盖管 |
| 使用手册 | 14-60800sc | 1份 | 无 |

本产品采用5孔盒包装 |
| **运输及保存** | 低温运输，-20℃保存，保存期限为12个月。 |
| **自备试剂** | 样品DNA。 |
| **使用方法** | **一、制备标准曲线样品**（以10E1-10E6拷贝/μL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，只提供无传染性的DNA片段作为阳性对照。1. 标记6个离心管，分别为6，5，4，3，2，1。
2. 用带芯枪头分别加入45μL荧光PCR专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。
3. 在6号管中加入5μL 阳性对照（其浓度为1×10E7拷贝/μL，试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得1×10E6拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在5号管中加入5μL 1×10E6拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E5拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在5号管中加入5μL 1×10E5拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E4拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到6个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

**二、样品DNA的制备**1. 用自选方法纯化样品的DNA，本产品跟市场上绝大多数核酸纯化产品兼容。
2. 如果有N个样品，则需要进行N+2个样品提取，多出的一个用作样品制备阳性对照管、另一个用作样品制备阴性对照管。可以用10μL第6步所得的第4号稀释液（1×10E4拷贝/μL）再加上一定量的水使总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样本体积一样，以此作为PC。另外用水作为NC。

**三、设置qPCR反应（20μL体系，在样品制备室进行）**1. 如果进行定量分析，则标记N+9个PCR管，其中N+2个用于上步得到的N+2个样品，1个用于PCR阴性对照，6个用于标准曲线样品。如果做定性分析，则6个标准曲线样品只选一个做（可以选4号，其余样品不变）。以下只介绍定量分析的反应设置。
2. 在标记管中按下表加入各成分：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **成分** | **N+2个****样品管** | **PCR阴性对照管** | **标准曲线****样品管（1-6管）** |
| 2×SYBR qPCR MasterMix | 10μL | 10μL | 各10μL |
| EB病毒染料法qPCR引物混合液 | 2μL | 2μL | 各2μL |
|  N+2个待测样品DNA模板 | 8μL | - | - |
| 自备超纯水 | - | 8μL | - |
| 第6步所得标准曲线样品稀释液（1-6号） | - | - | 各8μL（1号样到1号管，2号样到2号管…） |

1. 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℃ | 5 min |
| PCR反应（35个循环） | 95℃ | 15 sec |
| 60℃ | 40sec（采集SYBR通道的荧光信号） |
| 溶解曲线分析 |  | 按qPCR仪器手册执行 |

**四、数据处理**1. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有Ct值，但Tm值跟阳性对照Tm不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，数据无效，不予以分析。Tm跟阳性对照Tm一致的，为有效Ct。
2. 如果两种阴性对照的溶解曲线所得Tm值跟阳性对照的Tm值一样，说明环境或试剂可能有过去的PCR扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。
3. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和PCR阴性对照）是假阳性，可以继续分析其它样品有效数据。
4. 对定量检测，以阳性对照样品的浓度的log值为横轴，以有效Ct值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效Ct值从标准曲线上推算出样品DNA浓度的log值，再换算出待测样品的DNA浓度。
5. 对定性检测，则有有效Ct值的为阳性，无有效Ct值的为阴性。
 |
| **关联产品** | EB 病毒探针法荧光定量 PCR 试剂盒 |

 20210929xt