

天
净
沙
系
列

CAT#:15-30260

低温运输, -20℃保存

BINGENE

人疱疹病毒 6 型探针法荧光定量 PCR 试剂盒

Human Herpesvirus 6 Probe 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; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	人疱疹病毒 6 型 (Human Herpesvirus-6, HHV-6) 属疱疹病毒科 β 亚科, 为 1986 年从淋巴增生性疾病和艾滋病患者淋巴细胞中培养获得的一种新病毒。HHV-6 病毒颗粒呈球形, 有包膜, 平均直径约为 150 纳米, 基因组为线状双链 DNA。其基因结构和抗原性与其他已知的 5 种疱疹病毒不同。HHV-6 为嗜淋巴细胞病毒, 可在 T 型及 B 型淋巴细胞内复制。根据抗原性不同, 又可将 HHV-6 分为 A、B 两组。HHV-6 与人巨细胞病毒(HCMV /HHV-5)宿主相似, 主要感染 CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、单核巨噬细胞和 NK 细胞, 亦可在唾液腺、乳腺、肾脏中潜伏并持续进行低密度复制。病毒在淋巴细胞内复制时可产生明显的细胞病变, 并最终导致宿主细胞破裂、溶解。HHV-6 可通过唾液飞沫及密切接触、输血或器官移植传播。除免疫低下外, 绝大多数人感染后终身都不会产生明显症状; 免疫低下者, 潜伏的病毒可被激活并产生急性感染症状, 此时会出现间质性肺炎、脑炎、脑膜炎、肝炎及多器官衰竭等症状, 活化的病毒可大规模感染 T 淋巴细胞, 使免疫功能进一步削弱, 最后对人体健康产生较大影响, 因此人疱疹病毒 6 型的快速准确鉴定对该病的预防和治疗有着重要作用, 为此本公司开发了简单快捷的 HHV-6 探针法荧光定量 PCR 检测试剂盒, 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. 引物和探针经过优化, 分析灵敏性高, 能达到 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, 引物是根据人疱疹病毒 6 型 DNA 高度保守区设计, 不会跟其他病毒的 DNA 发生交叉反应。 5. 既可用于定性检测, 又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 各数量级。 6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。 7. 本产品只能用于科研。		
规格及成分	成分	编号	五孔盒包装
	2 $\times$ Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL (本色盖)
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (绿盖管)
	超纯水	210806	1 mL (蓝盖管)
	人疱疹病毒 6 型 qPCR 引物-探针混合液	15-30260yp	150 μ L (棕色管)
	人疱疹病毒 6 型 PCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E7 拷贝/ μ L)	pc30260	50 μ L (黄盖管)
	使用手册	15-30260sc	1 份

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、稀释标准曲线样品（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 45 μL 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 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(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 5 μL 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 4 号管中加入 5 μL 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 7. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10μL 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次核酸纯化所要求的起始样品体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。 8. 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相关产品和免核酸纯化样本释放剂。 三、Probe qPCR 反应（20μL 体系，在样品制备室进行） 9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，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（用水做模板），6 个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复，则标记 N+4 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（用水做模板），1 个用于 PCR 阳性对照（直接用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。 10. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复。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）： <table><tr><th>成分</th><th>样品管 N+2 个</th><th>PCR 阴性 对照</th><th>标准曲线样品管 (1-6 管)</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MagicMix</td><td>各 10 μL</td><td>10 μL</td><td>各 10 μL</td></tr><tr><td>人疱疹病毒 6 型 qPCR 引物-探针混合液</td><td>各 3 μL</td><td>3 μL</td><td>各 3 μL</td></tr><tr><td>N+2 个待测 DNA 样本</td><td>各 7 μL</td><td>不加</td><td>不加</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>不加</td><td>7 μL</td><td>不加</td></tr><tr><td>第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)</td><td>不加</td><td>不加</td><td>各 7μL (2 号样 到 2 号管, 3 号 样到 3 号管…)</td></tr></table> 11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR: <table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>预变性</td><td>94℃</td><td>5 min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>94℃</td><td>30 sec</td></tr><tr><td>58℃</td><td>40 sec (采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 BHQ1)</td></tr></table> 五、数据处理 12. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的 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。 13. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照 Ct 值必须大于等于 40 或为零。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于 40。对待测样品，如果其 Ct 大于等于 40 或为零则为阴性，如果小于 40 则为阳性。	成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性 对照	标准曲线样品管 (1-6 管)	2×Probe qPCR MagicMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL	人疱疹病毒 6 型 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL	N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加	超纯水	不加	7 μL	不加	第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7μL (2 号样 到 2 号管, 3 号 样到 3 号管…)	过程	温度	时间	预变性	94℃	5 min	PCR 反应 (45 个循环)	94℃	30 sec	58℃	40 sec (采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 BHQ1)
成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性 对照	标准曲线样品管 (1-6 管)																																	
2×Probe qPCR MagicMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL																																	
人疱疹病毒 6 型 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL																																	
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加																																	
超纯水	不加	7 μL	不加																																	
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7μL (2 号样 到 2 号管, 3 号 样到 3 号管…)																																	
过程	温度	时间																																		
预变性	94℃	5 min																																		
PCR 反应 (45 个循环)	94℃	30 sec																																		
	58℃	40 sec (采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 BHQ1)																																		
关联产品	人疱疹病毒 6 型探针法荧光定量 PCR 检测试剂盒（含内参）																																			