

天
净
沙
系
列

CAT#:15-30416
低温运输, -20℃保存

BINGENE

人乳头瘤病毒 16 型探针法荧光定量 PCR 试剂盒
Human Papillomavirus 16 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	人乳头瘤病毒(Human Papillomavirus, HPV)是一种属于乳多空病毒科的乳头瘤空泡病毒 A 属, 属于 DNA 病毒, 能引起人体皮肤黏膜的鳞状上皮增殖, 表现为寻常疣、生殖器疣（尖锐湿疣）等症状。随着性病中尖锐湿疣的发病率急速上升和宫颈癌、肛门癌等的增多, 人乳头瘤病毒感染越来越引起人们的关注。 人乳头瘤病毒有很 130 多种型, 其中人乳头瘤病毒 16 型 (HPV16) 属于高危型, 因此快速准确鉴定 HPV16 对该上述疾病的预防和检疫有着重要作用, 本产品就是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测人乳头瘤病毒 HPV16 的试剂盒, 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, 灵敏性高。 3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。 4. 特异性高, 引物是根据人乳头瘤病毒 16 型 DNA 的高度保守区设计, 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 个数量级。 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×Probe qPCR MagicMix	190303	500 μL（本色盖）
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL（红盖管）
	超纯水	100935	1 mL（紫盖管）
	HPV16 探针法 qPCR 引物-探针混合液	yp15-30416	150 μL（棕色管）
	HPV16 探针法 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	Pc30400	50 μL（黄盖管）
	使用手册	15-30416sc	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/ μ L 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 μ L 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 μ L $1 \times 10E7$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E6$ 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μ L $1 \times 10E6$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E5$ 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μ L $1 \times 10E5$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E4$ 拷贝/ μ L 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 个样品待提取，最好设置 N+2 个提取，多出的是 PC（样品制备阳性对照）和 NC（样品制备阴性对照）。可以取阳性对照的 10000 倍稀释液 10 μ L 再加上一定量的水，使总体积与待提取样品的规定体积一致，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 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的病毒 DNA 纯化试剂盒或免提核酸释放剂。

三、Probe qPCR 反应（20 μ L 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（用第 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)：														
	成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性 对照管	标准曲线 样品管 (1-6 管)											
	2×Probe qPCR MagicMix	10 μL	10 μL	各 10 μL											
	HPV16 探针法 qPCR 引物-探针混合液	3 μL	3 μL	各 3 μL											
	N+2 个待测 DNA 模板	7 μL	-	-											
	超纯水	-	7 μL	-											
	第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	-	-	各 7 μL (1 号样到 1 号管, 2 号样到 2 号管…)											
	11. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 PCR:														
	<table><tr><td>过程</td><td>温度</td><td>时间</td></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>5 min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>95℃</td><td>15 sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 TAMRA)</td></tr></table>				过程	温度	时间	预变性	95℃	5 min	PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec	60℃	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 TAMRA)
	过程	温度	时间												
预变性	95℃	5 min													
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec													
	60℃	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 TAMRA)													
四、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 RNA 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 必须大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长, 有典型扩增曲线, Ct 值应该小于或等于 35。对待测样品, 如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性, 如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间, 则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性, 如果小于 40, 则为阳性。															
关联产品	人乳头瘤病毒 16 型可视化 LAMP 检测试剂盒														

20220211dx