

天
净
沙
系
列

CAT#:15-88333

低温运输，-20℃保存

BINGENE

水痘-疱疹病毒 Oka 株探针法 qPCR 试剂盒

Varicella-Zoster Virus Oka Strain Probe PCR 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: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	水痘-疱疹病毒（Varicella-Zoster Virus）是一种双链 DNA 病毒，也被称作人类疱疹病毒 3 型，主要在人与人之间传播，传播方式可以是呼吸道传播，也可以是接触传播，人是其唯一的宿主。高桥道明（Michiaki Takahashi）分离并减毒成功的 Oka 株是全球水痘生产的标准株。因此快速检测水痘-疱疹病毒 Oka 株具有重要的意义。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水痘-疱疹病毒 Oka 株的试剂盒，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，分析灵敏性高，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，引物是根据水痘-疱疹病毒 DNA Oka 株高度保守区设计，不会跟其他生物的 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	本产品采用 5 孔盒包装 <table><tr><th>成分</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>981201</td><td>0.5 mL</td><td>0.5mL 本色管</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>180701</td><td>1 mL</td><td>1.5mL 绿盖管</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>210806</td><td>1 mL</td><td>1.5mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>水痘-疱疹病毒 Oka 株 qPCR 引物-探针混合液</td><td>yp15-88333rh</td><td>150 μL</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr><tr><td>水痘-疱疹病毒 Oka 株 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)</td><td>Pc15-88333R H-125</td><td>50 μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>15-88333sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>				成分	编号	规格	包装材料	2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5mL 本色管	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	水痘-疱疹病毒 Oka 株 qPCR 引物-探针混合液	yp15-88333rh	150 μL	0.5mL 棕色管	水痘-疱疹病毒 Oka 株 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	Pc15-88333R H-125	50 μL	0.5mL 黄盖管	使用手册	15-88333sc	1 份	无
成分	编号	规格	包装材料																													
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5mL 本色管																													
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																													
水痘-疱疹病毒 Oka 株 qPCR 引物-探针混合液	yp15-88333rh	150 μL	0.5mL 棕色管																													
水痘-疱疹病毒 Oka 株 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	Pc15-88333R H-125	50 μL	0.5mL 黄盖管																													
使用手册	15-88333sc	1 份	无																													
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 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^6 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 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 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 1×10^5 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^4 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 10 μL 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，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样品 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qPCR 反应（20 μL 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）：

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 MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
水痘-疱疹病毒 Oka 株 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…)											
	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>95℃</td><td>2 min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>94℃</td><td>15 sec</td></tr><tr><td>58℃</td><td>30 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 设置 TAMRA 为淬灭基团)</td></tr></table>				过程	温度	时间	预变性	95℃	2 min	PCR 反应 (45 个循环)	94℃	15 sec	58℃	30 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 设置 TAMRA 为淬灭基团)
	过程	温度	时间												
	预变性	95℃	2 min												
	PCR 反应 (45 个循环)	94℃	15 sec												
58℃		30 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 设置 TAMRA 为淬灭基团)													
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 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, 则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 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 40, 否则实验无效。如果实验有效, 则分析待测样品, 如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 40, 则为阴性。如果 Ct 小于 40 则为阳性。															
关联产品	水痘-疱疹病毒 Oka 株荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒														