

天
净
沙
系
列

CAT#:15-92999
低温运输, -20℃保存

BINGENE

人腺病毒探针法 qPCR 试剂盒

Human Adenovirus 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	人腺病毒属于哺乳动物腺病毒属，为无包膜的双链 DNA 病毒，病毒颗粒呈二十面体对称结构，直径 90~100nm，可划分为 A-G 共 7 个亚属，目前已发现至少 90 个基因型。由于不同人腺病毒对人体的组织嗜性不同，人腺病毒可导致多种人类疾病。因此快速准确检测人腺病毒具有重要意义。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所有 7 个亚属的人腺病毒通用型的试剂盒，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，引物是根据人腺病毒 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。 5. 可以检测 A-G 7 个亚属。 6. 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。 7. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。 8. 本产品只能用于科研。																															
规格及成分	本产品使用五孔盒包装 <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>0.5 mL（本色盖）</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>180701</td><td>1 mL</td><td>1.5 mL（绿色盖）</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>210806</td><td>1 mL</td><td>1.5 mL（蓝色盖）</td></tr><tr><td>人腺病毒探针法 qPCR 引物-探针混合液</td><td>yp15-92999</td><td>150 μL</td><td>1.5 mL（棕色盖）</td></tr><tr><td>人腺病毒探针法 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)</td><td>pc92999-NC011203</td><td>50 μL</td><td>0.5 mL（黄色盖）</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>15-92999sc</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	0.5 mL（本色盖）	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL（绿色盖）	超纯水	210806	1 mL	1.5 mL（蓝色盖）	人腺病毒探针法 qPCR 引物-探针混合液	yp15-92999	150 μL	1.5 mL（棕色盖）	人腺病毒探针法 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc92999-NC011203	50 μL	0.5 mL（黄色盖）	使用手册	15-92999sc	1 份	无
成分	编号	规格	包装材料																													
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5 mL（本色盖）																													
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL（绿色盖）																													
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL（蓝色盖）																													
人腺病毒探针法 qPCR 引物-探针混合液	yp15-92999	150 μL	1.5 mL（棕色盖）																													
人腺病毒探针法 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc92999-NC011203	50 μL	0.5 mL（黄色盖）																													
使用手册	15-92999sc	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 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 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 5μL 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 5μL 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）。可以上步所得第 4 号稀释液 10μL 再加一定量的水，使总体积与核酸纯化试剂盒所要求的待提取样品的起始体积一致，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相关产品或免提取核酸释放剂。
- 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（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 MasterMix	10μL	10μL	各 10μL

	人腺病毒探针法 qPCR 引物-探针混合液	3μL	3μL	各 3μL											
	N+2 个待测 DNA 模板	7μL	-	-											
	超纯水	-	7μL	-											
	第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	-	-	各 7μL (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>15sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60sec (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℃	15sec	60℃	60sec (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℃	15sec												
		60℃	60sec (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, 则阴性对照必须没有 Ct 值, 或者 Ct 值必须大于或等于 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 40。对待测样品, 如果没有 Ct 值, 或者 Ct 大于或等于 40 则为阴性, 如果小于 40 则为阳性。															
关联产品	人腺病毒探针法荧光定量 PCR 试剂盒														