

水痘-带状疱疹病毒探针法qPCR试剂盒 (含内参)

Varicella-Zoster Virus(VZV) Probe qPCR Kit (with internal control)

货号: BN66005

低温运输, -20℃保存

产品及特点

水痘-带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV) 属人类疱疹病毒 α 亚科, 又称人类疱疹病毒3型 (Human Herpes Virus Typs 3, HHV-3) 是水痘和带状疱疹的病原体, 其基因组为线性双链DNA分子, 长约124884bp。是一种儿童初次感染引起水痘, 恢复后病毒潜伏在体内, 少数病人在成人后病毒再发而引起带状疱疹的病毒。水痘是具有高度传染性的儿童常见疾病, 多发于2~6岁, 传染源主要是患者, 患者急性期水痘内容物及呼吸道分泌物内均含有病毒。曾患过水痘的病人引起带状疱疹后, 初期局部皮肤有异常感, 搔痒、疼痛, 进而出现红疹、疱疹, 串连成带状, 病程约3周左右, 少数可达数月之久, 还有可能出现脑脊髓炎和眼结膜炎等并发症。该病毒对人体健康有长期潜在危害, 因此水痘-带状疱疹病毒的快速准确鉴定对该病的预防和检疫有着重要作用, 为此本公司开发了简单快捷的水痘-带状疱疹病毒探针法荧光定量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, 可以达到100拷贝/ μ L。
3. 提供阳性对照和内参, 便于排除假阴性结果。
4. 特异性高, 引物是根据水痘-带状疱疹病毒高度保守区设计, 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各数量级。
6. 本产品足够50次20 μ L体系的探针法PCR反应。
7. 本产品只能用于科研。

本产品仅用于科研

TEL: 010-62960866 www.biorigin.Ltd

规格及成分

本产品使用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe PCR Magic Mix	60001	0.5 mL	0.5mL
荧光PCR专用模板稀释液	60002	1 mL	1.5 mL
水痘-带状疱疹病毒PCR引物-探针干粉 (含内参探针)	66005-3	50 次	0.5mL
水痘-带状疱疹病毒PCR阳性对照(1×10^7 拷贝/ μ L)	66005-4	50 μ L	0.5mL
水痘-带状疱疹病毒PCR内参(1×10^4 拷贝/ μ L)	66005-5	250 μ L	0.5mL
使用手册		1份	无

注：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入200 μ L超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为12个月。

自备物品

样品DNA。

使用方法

一、稀释含内参的标准曲线样品（以阳性对照 10^1 - 10^6 拷贝/ μ L这6个10倍稀释度和内参固定在 10^3 拷贝/ μ L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）。

1. 标记6个离心管，分别为6，5，4，3，2，1，0。
2. 在0号管中加入280 μ L荧光PCR专用模板稀释液，35 μ L本试剂盒提供的内参，震荡一分钟混匀。
3. 用带芯枪头分别将上步得到的混合液按45 μ L/管加入到标记的1-6号管中，最好用带芯枪头（下同）。
4. 在6号管中加入5 μ L 1×10^7 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得 1×10^6 拷贝/ μ L的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在5号管中加入5 μ L 1×10^6 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得 1×10^5 拷贝/ μ L的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 换枪头，在4号管中加入5 μ L 1×10^5 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得 1×10^4 拷贝/ μ L的标准曲线样品。放冰上待用。
7. 重复上面的操作直到得到6个稀释度的标准曲线阳性样品，每个样品中内参的浓度固定为 10^3 拷贝/ μ L。放冰上待用。

二、样品DNA的制备

8. 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制备要求的体积一样，以此作为PC。另外用水作为NC。最后在所有样本中加入5uL 本试剂盒提供的内参（共50000拷贝）。
9. 用自选方法纯化样品的DNA（含内参），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免提取核酸释放剂。

三、Probe qPCR反应（20μL体系，在样品制备室进行）

10. 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。
11. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一重复）：

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
水痘-带状疱疹病毒PCR 引物-探针混合液(含内参引物)	各4 μL	4 μL	各4 μL
N+2个待测DNA（含内参）	各6 μL	不加	不加
超纯水	不加	6 μL	不加
第6步所得标准曲线样品稀释液 (含内参，1-6号)	不加	不加	各6μL (2号样到 2号管，3号样到 3号管…)

12. 盖上盖子后上机，按下面参数进行PCR：

过程	温度	时间
预变性	95℃	3 min
PCR反应 (45个循环)	95℃	10 sec
	60℃	60 sec
	72℃	60 sec（采集FAM通道和HEX

通道的荧光信号,淬灭基团均为 TAMRA)

四、数据处理

13. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性,则整个扩增或制备实验无效,不需要分析数据,需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性,说明环境污染,则整个扩增或制备实验无效,不需要分析数据,需要跟厂家联系,购买新的引物和探针。对任何阴性样品,如果内参无Ct,则此样品的阴性结果无效,此样品需要重复实验。
14. 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,分别以阳性对照(FAM通道)和内参(HEX通道)的Ct值为纵轴,绘制标准曲线,阳性对照的标准曲线为斜线,r²必须大于0.95,内参的标准曲线为一条跟X轴平行的横线。再以待测样品的Ct值从阳性对照的标准曲线上推算出样品DNA浓度的log值,再推算出其浓度。
15. 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FAM通道的Ct必须大于或等于40。阳性对照FAM通道的荧光信号必须有对数增长,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。对任何FAM通道结果为阴性的样品,如果其对应的内参HEX通道无Ct,则此样品的阴性结果无效,此样品需要重复实验。