

水痘-带状疱疹病毒探针法荧光定量 PCR 试剂盒

Varicella-Zoster Virus Probe qPCR Kit

目录号: [ml108198](#)

使 用 说 明 书

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/μL。
 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 20μL 体系的探针法 PCR 反应。
- 本产品只能用于科研。体系的探针法 PCR 反应。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

| 成分 | 规格 | 包装 |
|---|-------|-----------|
| 2×Probe PCR Magic Mix | 0.5mL | 0.5mL 本色管 |
| 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 1mL | 1.5mL 绿盖管 |
| 水痘-带状疱疹病毒 PCR 引物-探针干粉 (含内参探针) | 50 次 | 0.5mL 棕盖管 |
| 水痘-带状疱疹病毒 PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL) | 50μL | 0.5mL 黄盖管 |
| 水痘-带状疱疹病毒 PCR 内参(1×10E4 拷贝/μL) | 250μL | 0.5mL 白盖管 |
| 使用手册 | 1 份 | 无 |
| 本产品使用五孔盒包装 | | |
| <p>注意: 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 200μL 超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。</p> | | |

使用方法

- 一、稀释含内参的标准曲线样品** (以阳性对照 10E1-10E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度和内参固定在 10E3 拷贝/μL 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, 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, 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 μ L 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。在所有样本中加入 5 μ L 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 (20 μ L 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（本表只列出一次重复）：

| 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 10μL | 10μL | 各 10μL |
| 水痘-带状疱疹病毒 PCR 引物-探针混合液(含内参引物) | 各 4μL | 4μL | 各 4μL |
| N+2 个待测 DNA (含内参) | 各 6μL | 不加 | 不加 |
| 超纯水 | 不加 | 6μL | 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 |

11. 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°C | 3min |
| PCR 反应 (40 个循环) | 95°C | 10sec |
| | 60°C | 60sec |
| | 72°C | 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。

| | |
|---------------------|---|
| | <p>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。</p> <p>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。</p> |
| <p>自备试剂</p> | <p>样品 DNA。</p> |
| <p>运输及保存</p> | <p>低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。</p> |