



人乳头瘤病毒 35 型探针法 qPCR 试剂盒

Human Papillomavirus 35 Probe qPCR Kit

仅

供

科

研

使

用

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 35 型 (HPV-35) 属于高危型, 因此快速准确鉴定 HPV-35 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 HPV-35 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 HPV-35 型 DNA 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	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	0.5mL	0.5mL 本色管
荧光 PCR 模板专用稀释	1mL	1.5mL 红盖管
超纯水	1mL	1.5mL 紫盖管
HPV-35 qPCR 引物-探针混合液干粉	50 次	0.5mL 棕色管
HPV-35 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	50μL	0.5mL 黄盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用五孔盒包装		
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 165uL 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20℃保存。		

一、稀释标准曲线样品 (以 1E1-1E6 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

使用方法	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，用带芯枪头，下同。 3. 在 6 号管中加入 5μL1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 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 5μL1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 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 5μL1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E4 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，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。 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 (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（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加）：

成分	样品管 N+2 个	RT-PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10μL	10μL	各 10μL
HPV-35 qPCR 引物-探针混合液	3μL	3μL	各 3μL
超纯水	不加	7μL	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

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℃	5min
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15sec
	60℃	1min（采集 FAM 通道，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 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。

PCR 编号	JN-E1273
说明书	1 份

自备试剂	超纯水, 样品 DNA
运输及保存	低温运输, -20℃保存, 有效期 2 年

生产企业: 上海纪宁实业有限公司

公司地址: 上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603

公司电话: 021-54721350

技术支持: 15800441226

