天净沙系列

CAT#:14-60800

低温运输，-20℃保存

天净沙

EB 病毒染料法 PCR 试剂盒

EB Virus SYBR PCR Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

EB 病毒（Epstein-Barr Virus，EBV，EB 病毒）是疱疹病毒科嗜淋巴细胞病毒属的成员，基因组为 DNA。EB 病毒具有在体内外专一性地感染人类及某些灵长类 B 细胞的生物学特性。人是 EB 病毒感染的宿主，主要通过唾液传播。无症状感染多 发生在幼儿，3～5 岁幼儿 90%以上曾感染 EB 病毒，90%以上的成人都有病毒抗体。EB 病毒是传染性单核细胞增多症的病原体，此外 EB 病毒与鼻咽癌、儿童淋巴瘤的 发生有密切相关性，被列为可能致癌的人类肿瘤病毒之一，因此、快速检测 EB 病毒具有重要的意义。本公司开发 EBV 染料法荧光定量 PCR 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. 引物经过优化，灵敏度高，分析灵敏度可以达到 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 EB 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. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的染料法荧光定量 PCR 反应。
6. 既可用于定性，也可用于定量。用于定量时线性范围至少 5 个数量级。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×SYBR qPCR MasterMix	990408	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 绿盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
EB 病毒染料法 PCR 引物干粉	yw14-60800	50 次	0.5 mL 白色盖
EB 病毒染料法 PCR 阳性对照 (1E7 拷贝/μL)	pc60800-NC007605	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	14-60800sc	1 份	1 份

注意：引物干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 110 μL 的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。

自备试剂

样品 DNA。

使用方法

一、制备标准曲线样品（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 阳性对照（其浓度为 1E7 拷贝/μL，试剂盒提供），充分震荡 1 分钟，得 1E6 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 1E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E4 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. 用自选方法纯化样品的 DNA，本产品跟市场上绝大多数核酸纯化产品兼容。
8. 如果有 N 个样品，则需要进行 N+2 个样品提取，多出的一个用作样品制备阳性对照管、另一个用作样品制备阴性对照管。可以用 10 μL 第 6 步所得的第 4 号稀释液（1E4 拷贝/μL）再加上一定量的水使总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样本体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。

三、设置 qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

9. 如果进行定量分析，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，6 个用于标准曲线样品。如果做定性分析，则 6 个标准曲线样品只选一个做（可以选 4 号，其余样品不变）。以下只介绍定量分析的反应设置。

10. 在标记管中按下表加入各成分：

成分	N+2 个样品管	PCR 阴性对照管	标准曲线样品管（1-6 管）
2×SYBR qPCR MasterMix	10 μL	10 μL	各 10 μL
EB 病毒染料法 PCR 引物混合液	2 μL	2 μL	各 2 μL
N+2 个待测样品 DNA 模板	8 μL	-	-
自备超纯水	-	8 μL	-
第 6 步所得标准曲线样品稀释液	-	-	各 8 μL(1 号样到

(1-6 号)			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（具体 PCR 参数可以根据仪器不同而自行优化

过程	温度	时间
预变性	95℃	5 min
PCR 反应 (35 个循环)	95℃	15 sec
	60℃	40sec（采集 SYBR 通道的荧光信号）
溶解曲线分析		按 qPCR 仪器手册执行

注：部分（如：伯乐 CFX96）机型如果两步法效果不理想可采用三步法：95℃ 5 分钟，（95℃ 15 秒、55℃ 15 秒、72℃ 30 秒）循环 35 次，每个循环第三步采集荧光信号。

四、数据处理

12. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有 Ct 值，但 Tm 值跟阳性对照 Tm 不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，数据无效，不予以分析。Tm 跟阳性对照 Tm 一致的，为有效 Ct。
13. 如果两种阴性对照的溶解曲线所得 Tm 值跟阳性对照的 Tm 值一样，说明环境或试剂可能有过去的 PCR 扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。
14. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 PCR 阴性对照）是假阳性，可以继续分析其它样品有效数据。
15. 对定量检测，以阳性对照样品的浓度的 log 值为横轴，以有效 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再换算出待测样品的 DNA 浓度。
16. 对定性检测，则有有效 Ct 值的为阳性，无有效 Ct 值的为阴性。

关联产品	EB 病毒可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒