天净沙系列

CAT#:15-88333

低温运输，-20℃保存

天净沙

水痘-带状疱疹病毒 Oka 株探针法 qPCR 试剂盒

Varicella-Zoster Virus Oka Strain Probe 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

水痘-带状疱疹病毒（Varicella-Zoster Virus）是一种双链 DNA 病毒，也被称作人类疱疹病毒 3 型，主要在人与人之间传播，传播方式可以是呼吸道传播，也可以是接触传播，人是其唯一的宿主。高桥道明（Michiaki Takahashi）分离并减毒成功的 Oka 株是全球水痘生产的标准株。因此快速检测水痘-带状疱疹病毒 Oka 株具有重要的意义。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水痘-带状疱疹病毒 Oka 株的试剂盒，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，分析灵敏度高，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，引物是根据水痘-疱疹病毒 DNA Oka 株高度保守区设计，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 个数量级。
6. 本产品足够 50 次 20 μL 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

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5 mL 本色管
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
水痘-带状疱疹病毒 Oka 株 qPCR 引物-探针干粉	yp15-88333rh	50 次	1.5 mL 棕色管
水痘-带状疱疹病毒 Oka 株 qPCR 阳性对照（1E7 拷贝/μL）	pc88333-AH010548	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	15-88333sc	1 份	无

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 165 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、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 1E7 拷贝/μL 的阳性对照（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 4 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. 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 10 μL 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。
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（20 μL 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最后加）：

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 MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
水痘-带状疱疹病毒 Oka 株 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加
超纯水	不加	7 μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7 μL（2 号样到 2 号管，3 号样到

			3 号管…)

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℃	5 min
PCR 反应 （45 个循环）	95℃	15 sec
	60℃	30 sec（采集 FAM 通道的荧光信号，设置 TAMRA 为淬灭基团）

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 45 次，每个循环第三步采集荧光信号。

四、数据处理

12. 如果样本制备阳性对照或 PCR 阳性对照（包括标曲样本）结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据，需要重新样本制备，重新进行 PCR 扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或 PCR 阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系。
13. 如果阴性对照和阳性对照均正常，则实验有效，可以进入后续分析。
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，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。
15. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 大于或等于 42。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 42，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 42，则为阴性。如果 Ct 小于 42 则为阳性。

关联产品	水痘-带状疱疹病毒 Oka 株可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒