天净沙系列

CAT#:15-30260-30270

低温运输，-20℃保存

天净沙

人疱疹病毒 6 型/7 型双重探针法 PCR 试剂盒

Human Herpesvirus Type 6/7 Duplex 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

本产品就是以探针法 PCR 技术为基础开发的专门检测与分型 HHV-6 和 HHV-7 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，便于排除假阴性结果。
4. 特异性高，引物是根据 HHV-6 和 HHV-7 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品只用于定性检测，不推荐用于定量检测。
6. HHV-6 和 HHV-7 分别用 HEX 和 FAM 标记，检测和分型同时完成。
7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
8. 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 模板专用稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
HHV-6/7 双重 PCR 引物-探针干粉	yp15-30260-30270	50 次	1.5 mL 棕色管
HHV-6 阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	pc30260 -KP257584	50 μL	0.5 mL 红盖管
HHV-7 阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	pc30270 -AF037218	50 μL	0.5 mL 白盖管
使用手册	sc15-30260-30270	1 份	无

注意：在使用前需要短暂离心引物-探针干粉管，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，超纯水。

使用方法

一、样品 DNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是样本制备 PC（阳性对照），一个是样本制备 NC（阴性对照）。可以用自备的、确定为阳性的样本作为样品制备 PC。可以用自备的、确定是阴性的样本作为样品制备 NC，可以用水替代。
2. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容。

二、Probe PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

3. 如果有 N+2 个核酸提取，则设置 N+5 个 PCR 反应，多出的 3 个 1 个用于 PCR NC，

另外 2 个分别用于 2 个待检测基因的 PCR PC。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 NC	HHV-6 PC	HHV-7 PC
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
HHV-6 型，7 型 双重 PCR 引物-探针溶液	各 3 μL	3 μL	3 μL	3 μL
N+2 个待测 DNA	各 7 μL	不加	不加	不加
超纯水	不加	7 μL	不加	不加
HHV-6 型阳性 对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	7 μL	不加
HHV-7 型阳性 对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	不加	7 μL

4. 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
	50℃	30 sec
	72℃	60 sec（采集 HEX 通道和 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

三、 数据处理

5. 原始数据分析。如果 FAM 通道和 HEX 通道的 Ct 大于或等于 40，或者没有 Ct 值，则判为该通道阴性。如果 Ct 小于 40，并且荧光信号呈现倒 S 的典型扩增曲线，则判断为该通道阳性。

6. 实验有效性分析:

6.1、PC：所有 PC 反应应该在对应的通道呈现阳性，如 HHV-6 型 PC 应该为 HEX 通道阳性，HHV-7 型 PC 应该为 FAM 通道阳性。如果样本制备 PC 在其对应的通道为阴性，则整个样本制备实验无效。如果两个基因的 PCR PC 在其对应的通道为阴性（如 HHV-7 型 PC 为 FAM 通道阴性），则整个 PCR 扩增实验无效。样本制备无效和扩增实验无效时均不需要分析数据，需要找到原因后再进行后续实验，可能原因包括操作失误、试剂变质或仪器故障。

6.2、NC：样本制备 NC 和 PCR NC 应该在所有通道呈阴性。如果样本制备 NC 或 PCR NC 结果在任何通道为阳性，则整个样本制备和 PCR 扩增实验无效，不需要分析数据，需要找到原因后再进行后续实验。可能原因是环境污染。

6.3、如果 PC 和 NC 均正常，则实验有效，可以对待测样本结果进行分析。

	7. 样本结果分析：如果 FAM 通道和 HEX 通道的 Ct 大于或等于 40，或者没有 Ct 值，则判为阴性。如果 Ct 小于 40，并且荧光信号呈现倒 S 的典型扩增曲线，则判断为该通道对应的基因阳性。HEX 通道阳性则表示含有 HHV-6 型基因，FAM 通道阳性则表示含有 HHV-7 型基因。
关联产品	人疱疹病毒 6 型，7 型，8 型三重探针法 PCR 试剂盒