



人乳头瘤病毒 (HPV) 6, 11 荧光定量 PCR 检测试剂盒

【前言】

本品采用聚合酶链式反应 (PCR) 结合 Taqman 荧光探针技术，对皮肤及粘膜上皮组织中的人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus) 6, 11 型的特异性 DNA 核酸片段进行检测，从而判断人乳头瘤病毒 6, 11 型核酸的存在。试剂盒中使用 dUTP 和 UNG 酶防止扩增产物的污染。

【规格】

32 人份

【试剂盒组成】

1	HPV PCR 缓冲液	600 μ l	7	HPV 阳性校准品 1 号 2×10^6 copy/ml	30 μ l
2	Taq 酶	64 μ l	8	HPV 阳性校准品 2 号 2×10^5 copy/ml	30 μ l
3	DNA 提取液	2 \times 0.8ml	9	HPV 阳性校准品 3 号 2×10^4 copy/ml	30 μ l
4	MgCl ₂	100 μ l			
5	HPV 荧光探针	100 μ l			
6	阴性对照	100 μ l			

【适用仪器】

本试剂盒在样本处理时应使用符合生物安全规范的负压操作台，适用于 LightCycler、Rotor-Gene、PE-5700 等基于 Taqman 技术原理设计的自动荧光 PCR 仪及相应软件。

【标本采集和处理】

尿道、阴道、宫颈分泌物：分泌物棉拭子放入有 1ml 注射用生理盐水的 1.5ml 离心管中，充分洗涤后挤干，弃去棉球，将浸出液 12,000rpm 离心 15 分钟，弃上清。在沉淀中加入 50 μ l DNA 提取液，吹打均匀后 100 $^{\circ}$ C 沸水浴 15 分钟，12,000rpm 离心 10 分钟。

【试剂准备、加样和 PCR 扩增】

- 1、试剂准备：按样品数 n 取 HPV PCR 缓冲液 (n+1) \times 18 μ l、MgCl₂ (n+1) \times 3 μ l、HPV 荧光探针 (n+1) \times 3 μ l、Taq 酶 (n+1) \times 2 μ l 混于一离心管中，旋涡振荡器上振荡混匀 10 秒，低速离心数秒，按每管 26 μ l 分装。
- 2、加样：将样品处理上清液（冻存样品使用前室温充分融化，振荡混匀数秒，13,000rpm 离心 2 分钟）和定量校准品（使用前应先离心，再充分振荡混匀）1-3 号各 4 μ l 分别加入反应管中，混匀后置于自动荧光 PCR 仪上，立即进行 PCR 扩增反应。（LightCycler 仪器：反应液配好后，分别取 20 μ l 移入专用毛细管中，低速离心数秒后置入 LightCycler—注意事项 8。）

LightCycler			
步骤	温度	时间	循环数
预反应	50 $^{\circ}$ C	1min	1
预变性	94 $^{\circ}$ C	2min	1
变性	94 $^{\circ}$ C	5sec	40
延伸	60 $^{\circ}$ C	30sec	
*升降温速率为 5 $^{\circ}$ C/sec *在 60 $^{\circ}$ C 时采集荧光信号，采集方式设为“SINGLE”			

PE-5700			
步骤	温度	时间	循环数
预反应	50 $^{\circ}$ C	1min	1
预变性	94 $^{\circ}$ C	2min	1
变性	94 $^{\circ}$ C	10sec	40
延伸	60 $^{\circ}$ C	50sec	

Rotor-Gene			
步骤	温度	时间	循环数
预反应	50 $^{\circ}$ C	1min	1
预变性	94 $^{\circ}$ C	2min	1
变性	94 $^{\circ}$ C	10sec	40
延伸	60 $^{\circ}$ C	50sec	
*对应信号通道输出值 (Gain) 定为 5 *在 60 $^{\circ}$ C 时 “Acquiring to Cycleon CH1” *建议使用 AXGEN 进口离心管扩增			

【结果分析】

LightCycler: 1. 选择荧光检测模式 F1/F2 进行定量分析，选用 Fit Points、Proportional 方式。

2. 在 Noise Band 界面上设定阈值，阈值设定应高于阴性对照线和样本噪音线的最高点，且阴性对照 Ct 值无任何数值（一般在 0.001-0.1 之间，参考值 0.05）。

3. 在 Analysis 界面调整基线使定量校准品呈现线性，且 Error < 0.1；或用 “Minimize Error” 自动调整。

PE-5700: 将定量 PCR 仪的荧光检测阈值定在 0.05。分析软件自动结合 3 个定量校准品制定标准曲



线，并计算各样品的定量结果。

Rotor-Gene: 1.对“CH1”进行 Quantitation，Graph 选择为 Linear Scale；

2.设置 Threshold 至基线在阴性对照曲线和各样本噪音线上方（参考值 0.05），并使定量校准品呈现线性。或选择“Auto-Find Threshold”自动分析。

【结果判断】

定性结果判断：

Ct 值无任何数值	阴性结果	
38≤Ct 值<40	检测灰区， 重新检测 2 次	复检 2 次，Ct 值无，阴性结果
		复检 2 次，其中至少 1 次 Ct 值<40，阳性结果
Ct 值<38	阳性结果	

定量结果判断：

样品中HPV DNA含量=Q。本试剂盒对HPV的有效定量范围在 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$ copy/ml。超出定量范围的样品请稀释或浓缩后重新测定。

【质量控制】

试剂盒中提供阳性校准品 1—3 号(全自动定量PCR仪给出的定量结果相应分别为Q₁、Q₂、Q₃)，阴性对照(Q_{阴性})，样品所对应的测量值为Q。如试剂质量完好并操作正确，阳性校准品应表现为阳性结果，阴性对照应表现为阴性结果，标准曲线相关系数在 0.99 以上,否则实验无效，应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差。每次检测均应设置阳性校准品和阴性对照品。

【保存条件及有效期】

试剂盒在-20℃保存，有效期为 8 个月。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：54460832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

