

HPV18 E6/E7 残留 DNA 片段分析
检测试剂盒
(PCR-荧光探针法)
说明书

货号：SK030307S-P

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点！

版本：A/4

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

SHENTEK® HPV18 E6/E7 残留 DNA 片段分析检测试剂盒用于检测分析 HeLa 细胞来源的 HPV18 E6/E7 DNA 残留片段量。

本试剂盒采用 PCR 荧光探针法，设计了不同的扩增片段（E6：100bp 和 288bp；E7：110bp 和 240bp）来分析样品中的 E6 和 E7 DNA 相应片段的残留水平。检测快速，专一性强，性能可靠。本试剂盒与 SHENTEK®宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒配套使用。

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

序号	组分	产品号	装量	储存条件
I	HPV E6/E7 DNA 定量参考品	NNA030	50 µL × 1 管	-18 °C及以下
	E6-100 primer&probe MIX	NNC055	300 µL × 1 管	-18 °C及以下，避光
	E6-288 primer&probe MIX	NNC056	300 µL × 1 管	-18 °C及以下，避光
	qPCR Reaction Buffer	NNB001	850 µL × 5 管	-18 °C及以下，避光
	DNA 稀释液	NND001	1.5 mL × 2 管	-18 °C及以下
	IPC MIX	NNC066	150 µL × 1 管	-18 °C及以下，避光
II	E7-110 primer&probe MIX	NNC057	300 µL × 1 管	-18 °C及以下，避光
	E7-240 primer&probe MIX	NNC058	300 µL × 1 管	-18 °C及以下，避光
	qPCR Reaction Buffer	NNB001	850 µL × 4 管	-18 °C及以下，避光
	DNA 稀释液	NND001	1.5 mL × 2 管	-18 °C及以下

■ 规格

4 ×100 Reactions。

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型（包括但不限于）

- 7500 Real-Time PCR System
- CFX96 定量 PCR 系统
- LineGene 9600plus 定量 PCR 系统

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5ml 无菌离心管
- 96 孔 qPCR 板
- 1000 μL , 100 μL , 10 μL 无菌低吸附带滤芯枪头

■ 相关设备

- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μL , 100 μL , 10 μL 移液枪

■ 实验操作流程

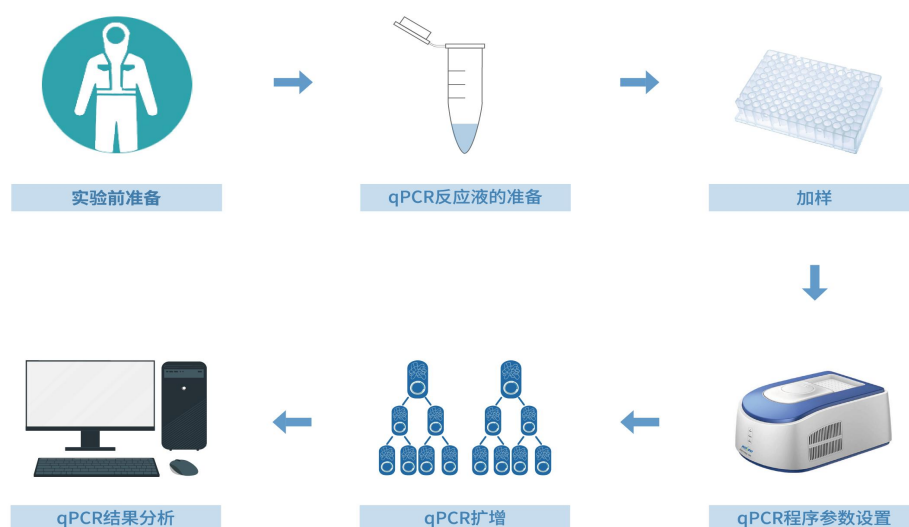


图 1 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

（一）实验前准备：

1. 穿戴适当的工作及保护服，至少穿戴无 DNA 污染的工作服、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
2. 工作台面、移液枪及离心管架紫外照射 30 分钟，喷洒 75%酒精并擦干。
3. 将试剂盒从冰箱-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下区域转移至 **2-8 $^{\circ}\text{C}$ 区域或冰上融化**，涡旋振荡混匀并瞬时离心。

(二) qPCR 反应液准备：

1. 反应孔数计算：根据检测样品的数量，计算所需反应孔数，一般做 3 个重复孔/样。

反应孔数=（6 个浓度梯度的标准曲线+ 1 个无模板对照 NTC+ 1 个
阴性质控 NCS +待测样品）×3

2. MIX 总量计算：根据反应孔数计算所需 MIX 总量。

MIX 总量 =（反应孔数+ 2）× 20 μL（含有 2 孔的损失量）

3. qPCR MIX 配制：根据表 2-5 配制表准备各试剂 qPCR MIX 用量。

表 2. E6-100 qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	17 μL
E6-100 primer&probe MIX	3 μL
总体积	20 μL

表 3. E6-288 qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	17 μL
E6-288 primer&probe MIX	3 μL
总体积	20 μL

表 4. E7-110 qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	17 μL
E7-110 primer&probe MIX	3 μL
总体积	20 μL

表 5. E7-240 qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	17 μL
E7-240 primer&probe MIX	3 μL
总体积	20 μL

将 qPCR MIX 充分混匀后按照 20 μL/管分装至 8 联管或 96 孔板中，置于冰上或 2-8 ℃条件下备用。

二、样品准备

● HPV E6/E7 DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

● HPV E6/E7 DNA 定量参考品的浓度标注于管壁标签，请确认后再进行稀释。

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将定量参考品进行梯度稀释，具体操作如下：

1. 将试剂盒中的参考品和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8℃条件下融化，待完全融化后，轻弹数下混匀，短时间快速离心 3~5s，如此重复 3 次。
2. 取 6 支干净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6。
3. 在 ST0 管中用 DNA 稀释液将参考品稀释至 $1 \times 10^8 \text{copies}/\mu\text{L}$ ，得到 ST0，振荡混匀后短时间快速离心 3~5s，重复 3 次以确保定量参考品与 DNA 稀释液充分混匀。
4. 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6 管中分别加入 180 μL DNA 稀释液。
5. 按表 2 依次进行 6 次稀释操作。

表 6. HPV DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度 (copies / μL)
ST1	20 μL ST0 + 180 μL DNA 稀释液	1×10^7
ST2	20 μL ST1 + 180 μL DNA 稀释液	1×10^6
ST3	20 μL ST2 + 180 μL DNA 稀释液	1×10^5
ST4	20 μL ST3 + 180 μL DNA 稀释液	1×10^4
ST5	20 μL ST4 + 180 μL DNA 稀释液	1×10^3
ST6	20 μL ST5 + 180 μL DNA 稀释液	1×10^2

已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8 °C。

若 DNA 稀释液中有析出，建议于 37 °C 条件下进行孵育。

标准曲线浓度点可根据实际验证结果选择，应至少有 5 个浓度点。

● 阴性对照 (NCS)

1. 取 100 μL DNA 稀释液加入 1.5 mL 干净的离心管中，标记为阴性质控 NCS。
备注：阴性质控 NCS 和同批待测样品一起进行样品前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

三、操作步骤

（一）加样

1. 各试剂置于冰上，轻轻振荡混匀，选择各自扩增片段按表 7-10 所示加样：

表 7. E6-100 各反应孔加样示例

各样品	加样量
E6-100 标准曲线	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5/ST6
无模板对照 NTC	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L DNA 稀释液
阴性质控 NCS	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 待测样品纯化液

表 8. E6-288 各反应孔加样示例

各样品	加样量
E6-288 标准曲线	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5/ST6
无模板对照 NTC	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L DNA 稀释液
阴性质控 NCS	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 待测样品纯化液

表 9. E7-110 各反应孔加样示例

各样品	加样量
E7-110 标准曲线	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5/ST6
无模板对照 NTC	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L DNA 稀释液
阴性质控 NCS	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 待测样品纯化液

表 10. E7-240 各反应孔加样示例

各样品	加样量
E7-240 标准曲线	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5/ST6
无模板对照 NTC	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L DNA 稀释液
阴性质控 NCS	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 待测样品纯化液

（二）IPC 组配制反应液的制备和加样

1. 每次实验需做一个无模板对照 NTC 和各个待测样品的 IPC 检测，根据表 11 和表 12 配制。

表 11. IPC qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
IPC MIX	1.3 μL
ddH ₂ O	2.8 μL
总体积	20 μL

表 12. IPC 各反应孔加样示例

各样品	加样量
无模板对照 NTC	20 μL IPC qPCR MIX + 10 μL DNA 稀释液
待测样品	20 μL IPC qPCR MIX + 10 μL 待测样品纯化液

表 13. 96 孔板排版示例

E6-100						E6-288						
NTC	NTC	NTC	S1	S1	S1	S1	S1	S1	NTC	NTC	NTC	A
NCS	NCS	NCS	S2	S2	S2	S2	S2	S2	NCS	NCS	NCS	B
ST6	ST6	ST6							ST6	ST6	ST6	C
ST5	ST5	ST5							ST5	ST5	ST5	D
ST4	ST4	ST4							ST4	ST4	ST4	E
ST3	ST3	ST3	IPC-S1	IPC-S1	IPC-S1				ST3	ST3	ST3	F
ST2	ST2	ST2	IPC-S2	IPC-S2	IPC-S2				ST2	ST2	ST2	G
ST1	ST1	ST1	IPC-NTC	IPC-NTC	IPC-NTC				ST1	ST1	ST1	H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

- ✧ 该示例表示的是针对 E6-100 和 E6-288 检测分别做 6 个浓度梯度的标准曲线（ST1~ST6）、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、2 个待测样品（S1，S2），还有针对 IPC 的无模板对照 NTC（IPC-NTC）和待测样品的 IPC（IPC-S1，IPC-S2）。建议做 3 个重复孔。
- ✧ 实际检测时可根据样品多少，参照此示例进行 96 孔板排版加样。

（三）qPCR 程序设置

以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 1.4 为例。

选择 FAM 通道代表 E6/E7 检测信号，选择 VIC 通道代表 IPC 检测信号。

举例如下：

1. 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。
2. 创建新检测探针，例如命名为 E6-100，选择报告荧光基团为 FAM，猝灭荧光基团为 none。创建新检测探针，命名为 IPC，选择报告荧光基团为 VIC，猝灭荧光基团为 none；检测参比荧光为 ROX。
3. 设置两步法反应程序：
95°C 预变性 10min；
95°C 15 s, 60°C 1 min（读取荧光），40 个循环； 反应体积 30μl。

四、结果计算与判断

1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中，将 Threshold 设置为 **0.02**，点击 Analyze，此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。
 2. 在 Results 的 Plate 面板中，将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard，并且在 Quantity 一栏分别赋值 $1e+007$ 、 $1e+006$ 、 $1e+005$ 、 $1e+004$ 、 $1e+003$ 、 $1e+002$ （单位为 copies /μL），并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。
 3. 在 Results 的 Plate 面板中，将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC，将阴性质控 NCS 孔、待测样品孔的 Task 一栏设置为 Unknown，并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S，之后点击 .
 4. 在 Results 的 Standard Curve 面板中，可读取标准曲线的斜率（Slope）、截距（Intercept）、 R^2 。
 5. 在 Results 的 Report 面板中，Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品，单位为 copies /μL。
 6. 基于实际样品基质与 NCS 基质存在差异，请优先考虑样品回收率结果；如未测试加标样品，则样品的 Ct -IPC 值应该与 NCS 的 Ct -IPC 值一致或 ±1，如样品的 Ct -IPC 值与 NCS 的 Ct -IPC 值超出 ±1，则表明样品可能存在抑制。
-  结果分析的参数设置需依据具体的机型及使用的软件版本，一般也可由仪器自动判读。

修订日期：2024 年 06 月 14 日

生效日期：2024 年 06 月 20 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话：400-878-2189