

Code No. 6602

研究用

TaKaRa

PCR Human Papillomavirus
Detection Set

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 原 理	1
● Control Template	2
● 操作方法	2
● 参考文献	3
● 相关产品	3

● 制品说明

本制品是用于检测高发性宫颈癌的试剂盒，可对人乳头状瘤病毒 Human Papillomavirus (HPV)的 16、18 及 33 型进行特异性地扩增、检出。试剂盒中包含对 HPV16、18 及 33 型的 E6 基因 (HPV16、18 型 140 bp, HPV33 型 141 bp) 进行扩增的引物及扩增后用于杂交的 HPV16、18 及 33 型特异性探针。

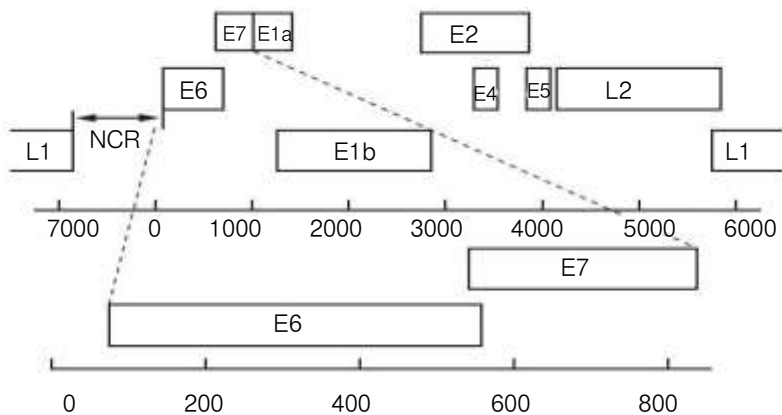
● 制品内容 (100 μ l 反应 \times 50 次量, 50 μ l 反应 \times 100 次量)

1. HPVpF (common forward primer) (25 pmol/ μ l)	100 μ l
2. HPVp16R (HPV16 reverse primer) (25 pmol/ μ l)	50 μ l
3. HPVp18R (HPV18 reverse primer) (25 pmol/ μ l)	50 μ l
4. HPVp33R (HPV33 reverse primer) (25 pmol/ μ l)	50 μ l
5. HPVb16 (HPV16 probe) (25 pmol/ μ l)	10 μ l
6. HPVb18 (HPV18 probe) (25 pmol/ μ l)	10 μ l
7. HPVb33 (HPV33 probe) (25 pmol/ μ l)	10 μ l
8. Control Template HPV T16 (HPV16) (1 ng/ μ l)	50 μ l
HPVT18 (HPV18) (1 ng/ μ l)	50 μ l
HPVT33 (HPV33) (1 ng/ μ l)	50 μ l

● 保 存

-20 $^{\circ}$ C

● 原 理



HPVpF \longrightarrow
 \longleftarrow HPVp16R, HPVp18R, HPVp33R

\longrightarrow
 HPVb16, HPVb18, HPVb33

HPVpF	5'-AAGGCGTAACCGAAATCGGT-3'
HPV16R	5'-GTTTGCAGCTCTGTGCATA-3'
HPV18R	5'-GTGTTTCAGTTCCTGCACA-3'
HPV33R	5'-GTCTCCAATGCTTGGCACA-3'
HPVb16	5'-CATTTTATGCACAAAAGAGAACTGCAATG-3'
HPVb18	5'-TGAGAAACACACCACAATACTATGGCGCGC-3'
HPVb33	5'-CATTTTGCAGTAAGGTAAGTACTGCACGACTATG-3'

● Control Template

试剂盒中含有的 Control Template 可监控 PCR 扩增反应是否正常。分别以 HPV16, HPV18 和 HPV33 为模板, 以各自相应的一对引物 HPVpF/HPVp16R, HPVpF/HPVp18R, HPVpF/HPVp33R 进行 PCR 扩增, 可获得 70 bp 的扩增产物。同时 Control Template 的 DNA 序列与试剂盒中含有的探针序列互补, 因此也可作为斑点杂交时的 Positive Control。

● 操作方法

A. 基因组 DNA 的制备

1. 在 300 μ l 反应液 (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 5 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.2 mg/ml Proteinase K) 中加入组织标本后, 37 $^{\circ}$ C 反应 12 小时进行 Proteinase K 处理。
2. 加入 300 μ l 苯酚/氯仿溶液后混合, 12,000 rpm 离心 10 分钟, 将水层 (上层) 移至新的离心管中。
3. 加入 300 μ l 氯仿/异戊醇溶液后混合, 12,000 rpm 离心 10 分钟, 将水层 (上层) 移至新的离心管中。
4. 加入 600 μ l 无水乙醇和 30 μ l 的 3M CH₃COONa, 于 -20 $^{\circ}$ C 放置 1 小时 (或 -70 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟), 12,000 rpm 离心 10 分钟后回收沉淀物。
5. 80% 乙醇清洗沉淀物, 干燥后用灭菌水溶解基因组 DNA。

B. PCR 反应

1. 反应液的配制

使用 *TaKaRa Taq*TM 配制下面的反应液。

< HPV16, 18, 33 DNA 在同一反应管中同时扩增时 >

100 μ l 反应体系

10 \times PCR Buffer*	10 μ l
dNTP Mixture*(各 2.5 mM)	8 μ l
HPVpF	2 μ l
HPVp16R	1 μ l
HPVp18R	1 μ l
HPVp33R	1 μ l
<i>TaKaRa Taq</i> TM (5 U/ μ l)	0.5 μ l
样品基因组 DNA	1 μ g
灭菌水	up to 100 μ l

50 μ l 反应体系

10 \times PCR Buffer*	5 μ l
dNTP Mixture*(各 2.5 mM)	4 μ l
HPVpF	1 μ l
HPVp16R	0.5 μ l
HPVp18R	0.5 μ l
HPVp33R	0.5 μ l
<i>TaKaRa Taq</i> TM (5 U/ μ l)	0.25 μ l
样品基因组 DNA	0.5 μ g
灭菌水	up to 50 μ l

* *TaKaRa Taq*TM 附带的试剂

< HPV16, 18, 33 DNA 分别在不同反应管中扩增时 >

100 μ l 反应体系

10 \times PCR Buffer*	10 μ l
dNTP Mixture*(各 2.5 mM)	8 μ l
HPVpF	2 μ l
HPVp16R	1 μ l
或 HPVp18R	
或 HPVp33R	
<i>TaKaRa Taq</i> TM (5 U/ μ l)	0.5 μ l
样品基因组 DNA	1 μ g
灭菌水	up to 100 μ l

50 μ l 反应体系

10 \times PCR Buffer*	5 μ l
dNTP Mixture*(各 2.5 mM)	4 μ l
HPVpF	0.5 μ l
HPVp16R	0.5 μ l
或 HPVp18R	
或 HPVp33R	
<i>TaKaRa Taq</i> TM (5 U/ μ l)	0.25 μ l
样品基因组 DNA	0.5 μ g
灭菌水	up to 50 μ l

* *TaKaRa Taq*TM 附带的试剂

2. 如果需要, 在反应液的上层加一滴矿物油 (约 50 μ l), 按照下面的反应条件进行 PCR 反应。

94°C	30 sec	} 30 cycles
55°C	2 min	
72°C	30 sec	

3. 反应结束后, 清除矿物油。取 10 μ l PCR 反应液进行 4%的 NuSieve[®] 3:1 Agarose 凝胶电泳, 确认 DNA 扩增片段。(HPV16、18 可获得 140 bp 的扩增片段, HPV33 可获得 141 bp 的扩增片段。)

C. 斑点杂交法进行 HPV DNA 的检出

HPV16, 18, 33 DNA 在一个反应管中同时扩增后, 使用 HPV16, 18, 33 特异性寡核苷酸探针进行斑点杂交, 可高灵敏度地检测出 HPV DNA。利用 DNA 5' 末端标记试剂盒 MEGALABEL, 可以对寡核苷酸探针进行高效的 ³²P 标记。

1. 将扩增的 DNA 固定在尼龙膜上

将 B. 的 PCR 反应液移至新的 0.5 ml 反应管中 (注意不要混入矿物油), 94°C 热变性 10 分钟后冰上放置 5 分钟。

准备 3 张尼龙膜, 分别在 3 张尼龙膜上点加 1 μ l PCR 反应液, 干燥后 UV 照射 5 分钟以固定 DNA。

2. 预杂交

将上述 1 的膜分别在 prehybridization buffer 中 37°C 预杂交 2 小时。

prehybridization buffer

}	5 \times Denhardts
	5 \times SSC
	0.1% SDS
	0.1 mg/ml salmon testis DNA

3. 探针的标记

利用 MEGALABEL™ 进行探针的标记 (37°C 反应 30 分钟)

在微量离心管中配制下列反应液。

HPVb16, HPVb18 或 HPVb33	1 μ l (25 pmol)
10 \times phosphorylation buffer	1 μ l
T4 Polynucleotide Kinase	1 μ l (10 U)
灭菌水	2 μ l
[γ - ³² P] ATP (370 MBq/ml) *2	5 μ l

* 2: MEGALABEL™ 试剂盒中不含有 [γ -³²P] ATP, 需自备。

4. 杂交

将标记后的探针 (约 1×10^8 cpm) 分别加入到上述 2 的预杂交溶液中, 37°C 反应 2 小时。

5. 在室温下使用 2 \times SSC (含 0.1% SDS) 每隔 10 分钟清洗一次膜, 共清洗 2 次。然后在 55°C 下使用 0.2 \times SSC (含 0.1% SDS) 每隔 10 分钟清洗一次膜, 共清洗 2 次。

6. 将膜干燥后放射自显影。

● 参考文献

Shimada, M., Fukushima, M., Mukai, H., Kato, I., Nishikawa, A. and Fujinaga, K. (1990) *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 1-5.

● 相关产品

TaKaRa Taq™ (Code No. R001A/B/C)

MEGALABEL™ (Code No. 6070)

NuSieve[®] 3:1 Agarose (Code No. 50091/50090)

Proteinase K (Code No. 9034)

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>