

# 人多瘤病毒 6 探针法 qPCR 试剂盒

## Human Polyomavirus 6 Probe qPCR Kit

目录号: [ml104423](#)

# 使 用 说 明 书

### 产品及特点

人类多瘤病毒 6 (Human Polyomavirus 6, HpyV6) 是一种人多瘤病毒, 其基因组是一条长为 5000 bp 左右的闭合环状双链 DNA。相对于已知的其他人多瘤病毒, 如 BK 病毒 (BK virus, BKV) 和 JC 病毒 (JC virus, JCV) 等, 人们对 2008 年才发现的人类多瘤病毒 6 知之甚少, 因此快速检测人类多瘤病毒 6 对研究此病毒具有重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测人多瘤病毒 6 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, 引物是根据人多瘤病毒 6 DNA 高度保守区设计, 不会跟其他细

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                |            |            |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|
|       | <p>菌的 DNA 发生交叉反应。</p> <p>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。</p> <p>6. 本产品足够 50 次 20 <math>\mu</math>L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。</p> <p>7. 本产品只能用于科研。</p>                                                                                                                                     |            |            |
| 规格及成分 | 成分                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 规格         | 包装         |
|       | 2×Probe qPCR MasterMix                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0.5mL      | 0.5mL 本色管  |
|       | 荧光 PCR 专用模板稀释液                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 1mL        | 1.5 mL 红盖管 |
|       | 探针法 qPCR 特异性增强剂                                                                                                                                                                                                                                                                                | 50 $\mu$ L | 0.5 mL 蓝盖管 |
|       | 人多瘤病毒 6 qPCR 引物-探针干粉                                                                                                                                                                                                                                                                           | 50 次       | 0.5mL 棕色管  |
|       | KI 多瘤病毒 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/ $\mu$ L)                                                                                                                                                                                                                                                             | 50 $\mu$ L | 0.5mL 黄盖管  |
|       | 使用手册                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 1 份        | 1 份        |
|       | 本产品使用五孔盒包装                                                                                                                                                                                                                                                                                     |            |            |
|       | <p><b>注意：</b>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 162 mL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。</p>                                                                                                                                                                                                                 |            |            |
| 使用方法  | <p>一、<b>稀释标准曲线样品</b> (以 1E1-1E6 拷贝/<math>\mu</math>L 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。</p> <p>1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。</p> <p>2. 用带芯枪头分别加入 45 <math>\mu</math>L 荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头，下同)。</p> |            |            |

3. 在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E7 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1E6 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E6 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E5 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 4 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E5 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E4 拷贝/ $\mu\text{L}$  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, 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  $\mu\text{L}$  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。
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 $\mu\text{L}$ 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加) :

| 成分 | 样品管 N+2 个 | PCR 阴性对照 | 标曲样品管 (1-6) |
|----|-----------|----------|-------------|
|----|-----------|----------|-------------|

|                          |        |      |        |
|--------------------------|--------|------|--------|
| 2×Probe qPCR MagicMix    | 各 10μL | 10μL | 各 10μL |
| 人多瘤病毒 6 qPCR 引物-探针混合液    | 各 3μL  | 3μL  | 各 3μL  |
| 探针法 qPCR 特异性增强剂          | 1μL    | 1μL  | 1μL    |
| N+2 个待测 DNA 样本           | 6μL    | -    | -      |
| 超纯水                      | -      | 6μL  | -      |
| 第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号) | -      | -    | 各 7μL  |

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℃ | 5min                          |
| PCR 反应<br>(45 个循环) | 95℃ | 15sec                         |
|                    | 60℃ | 15sec                         |
|                    | 72℃ | 15sec (采集 FAM 通道，淬灭基团为 TAMRA) |

#### 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 40。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 40，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 40，则为阴性。如果 Ct 小于 40 则为阳性。

|       |                      |
|-------|----------------------|
| 自备试剂  | 超纯水，样品 DNA。          |
| 运输及保存 | 低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。 |