

上海通尉

TW—reagent.com 上海通尉

# 人多瘤病毒 6 探针法 qPCR 试剂盒

Human Polyomavirus 6 Probe qPCR Kit

仅

供

科

研

使

用

### 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, 不会跟其他细菌的 DNA 发生交叉反应。
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。
6. 本产品足够 50 次 20  $\mu$ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
7. 本产品只能用于科研。

### 规格及成分

成分	规格	包装
2 $\times$ Probe qPCR MasterMix	0.5mL	0.5mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 红盖管
探针法 qPCR 特异性增强剂	50 $\mu$ L	1.5mL 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
本产品采用五孔盒包装		
<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 $^{\circ}$ C 保存。		

### 使用方法

**一、稀释标准曲线样品** (以 1E1-1E6 拷贝/ $\mu$ 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。

1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。
2. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu\text{L}$  荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头，下同)。
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。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	标准曲线样品管 (1-6 管)
2×Probe qPCR MasterMix	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	各 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 (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。
<b>PCR 编号</b>	TW-E10031
<b>说明书</b>	1 份
<b>自备试剂</b>	超纯水，样品 DNA
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20℃保存，有效期 2 年

**生产企业：上海通蔚实业有限公司**

**公司地址：上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603**

**公司电话：021-54845833**

**技术支持：15800441009**