



猴痘病毒探针法 qPCR 试剂盒

Monkeypox Virus Probe qPCR Kit

货号: JLC_Y7400

使

用

说

明

书

产品及特点

猴痘病毒 (Monkeypox Virus) 属正痘病毒属, 可在非洲绿猴肾细胞中培养生长, 导致细胞病变。人类感染猴痘, 主要通过被已感染的动物咬伤, 或直接接触被感染动物的血液、体液、猴痘病损而受染; 通常由动物传给人, 偶也可以发生人到人的猴痘传播。一般认为是在直接的、长时间面对面的接触中, 通过含毒的大量呼吸飞沫而传播。猴痘还可以通过直接接触感染者的体液或病毒污染的物品 (如衣服和被褥) 而传播。主要临床症状为发热、剧烈头痛、淋巴结肿大、背痛、肌肉痛 (肌肉疼痛) 以及倍感无力 (精神不振)。因此快速检测猴痘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猴痘病毒的试剂盒, **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, 分析灵敏性高, 可以达到 100 拷贝/ μ L。
- 3. 提供阳性对照和内参, 便于排除假阴性结果。
- 4. 特异性高, 引物是根据猴痘病毒高度保守区设计, 不会跟其他生物的 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 各数量级。
- 6. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法 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×Probe PCR Magic Mix	0.5mL	0.5 mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1 mL	1.5 mL 绿盖管
猴痘病毒 PCR 引物-探针混合液 (含内参探针)	50 次	0.5mL 棕色管
猴痘病毒 PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5 mL 黄盖管
猴痘病毒 PCR 内参(1×10E4 拷贝/ μ L)	250 μ L	0.5mL 白色管
使用手册	1 份	无
本产品使用五孔盒包装		
注 意: 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 200 μ L 超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20℃保存。		

使用方法

一、稀释含内参的标准曲线样品 (以阳性对照 10E1-10E6 拷贝/ μ L 这 6 个 10 倍稀释度和内参固定在 10E3 拷贝/ μ L 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)。

1. 标记 6 个离心管, 分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0。
2. 在 0 号管中加入 280 μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液, 35 μ L 本试剂盒提供的内参, 震荡一分钟混匀。
3. 用带芯枪头分别将上步得到的混合液按 45 μ L/管加入到标记的 1-6 号管中, 用带芯枪头(下同)。
4. 在 6 号管中加入 5 μ L 1×10^7 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^6 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 5 号管中加入 5 μ L 1×10^6 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^5 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 换枪头, 在 4 号管中加入 5 μ L 1×10^5 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^4 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
7. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线阳性样品, 每个样品中内参的浓度固定为 10^3 拷贝/ μ L。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

8. 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 μ 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。另外用水作为 NC。在所有样本中加入 5 μ L 本试剂盒提供的内参 (共 50000 拷贝)。
9. 用自选方法纯化样品的 DNA (含内参), 本试剂盒跟市场上大多数 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 μ L 体系, 在样品制备室进行)

10. 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。

11. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复）：

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 MagicMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
猴痘病毒 PCR 引物-探针混合液(含内参引物)	各 4 μL	4 μL	各 4 μL
N+2 个待测 DNA（含内参）	各 6 μL	不加	不加
超纯水	不加	6 μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液（含内参，1-6 号）	不加	不加	各 6 μL

12. 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℃	3 min.
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec.
	60℃	60 sec.
	72℃	60 sec（采集 FAM 通道和 HEX 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

四、数据处理

13. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系，购买新的引物和探针。对任何阴性样品，如果内参无 Ct，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。

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，分别以阳性对照（FAM 通道）和内参（HEX 通道）的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照的标准曲线为斜线，r2 必须

	大于 0.95，内参的标准曲线为一条跟 X 轴平行的横线。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照的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 FAM 通道的 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照 FAM 通道的荧光信号必须有对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于或等于 35。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性，如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性，如果小于 40，则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的样品，如果其对应的内参 HEX 通道无 Ct，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。
自备试剂	样品 DNA。
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。

生产企业：上海机纯实业有限公司

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：021-54720761

技术支持：13166274223