

# 人多瘤病毒 6 探针法 qPCR 试剂盒

## Human Polyomavirus 6 Probe qPCR Kit

CAT#:BN63209

低温运输, -20℃保存

### 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                                  | 编号      | 规格         |
|-------------------------------------|---------|------------|
| 2 $\times$ Probe qPCR MasterMix     | 60001   | 0.5 mL     |
| 荧光 PCR 专用模板稀释液                      | 60002   | 1 mL       |
| 探针法 qPCR 特异性增强剂                     | 60003   | 50 $\mu$ L |
| 人多瘤病毒 6 qPCR 引物-探针干粉                | 63209-4 | 50 次       |
| 人多瘤病毒 6 qPCR 阳性对照 (1E7 拷贝/ $\mu$ L) | 63209-5 | 50 $\mu$ L |

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 162  $\mu$ L 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20℃保存。

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 运输及保存 | 低温运输，-20℃保存，保存期限为 24 个月。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
| 自备试剂  | 超纯水，样品 DNA。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
| 使用方法  | <p><b>一、稀释标准曲线样品（以 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例）。</b></p> <p>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> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。</li> <li>2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。</li> <li>3. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E4 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>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。</li> </ol> <p><b>二、样品 DNA 的制备</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>7. 如果有 N 个样品，最好设置 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 μL 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。</li> <li>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。</li> </ol> <p><b>三、Probe qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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</li> </ol> | 16. |

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最后加):

| 成分                          | 样品管<br>N+2 个 | PCR<br>阴性对照 | 标曲样品管<br>(1-6)                           |
|-----------------------------|--------------|-------------|------------------------------------------|
| 2×Probe qPCR<br>MagicMix    | 各 10 μL      | 10 μL       | 各 10 μL                                  |
| 人多瘤病毒 6 qPCR<br>引物-探针混合液    | 各 3 μL       | 3 μL        | 各 3 μL                                   |
| 探针法 qPCR 特异性增强剂             | 1 μL         | 1 μL        | 1 μL                                     |
| N+2 个待测 DNA 样本              | 6 μL         | -           | -                                        |
| 超纯水                         | -            | 6 μL        | -                                        |
| 第 6 步所得标准曲线样品稀<br>释液(1-6 号) | -            | -           | 各 6 μL (1 号样到 1<br>号管,2 号样到 2 号<br>管...) |

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

- |  |                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | <p>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。</p> <p>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。</p> |  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|