



# 小鼠微小病毒探针法 qPCR 试剂盒

Minute Virus Of Mice Probe PCR Kit

仅

供

科

研

使

用

小鼠微小病毒 (Minute Virus of Mice, MVM) 是副病毒科的小型无包膜单链 DNA 病毒，全长约 5-6kb。小鼠微小病毒广泛存在于实验小鼠和野生小鼠样中，具有高度传染性。MVM 主要是通过都毒小鼠粪便和尿液向外排出，易感小鼠经直接或间接接触而感染，也可经胎盘垂直传播/但不能通过空气传播。MVM 感染小鼠后，通常无明显临床症状，但研究表明，在涉及免疫系统，肿瘤和移植实验中，实验小鼠感染了 MVM 将会严重影响实验数据的准确性和可信性，因此快速检测小鼠微小病毒具有重要意义。本产品是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测小鼠微小病毒的试剂盒，**它具有下列特点：**

## 产品及特点

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，引物是根据小鼠微小病毒 DNA 高度保守区设计，不会跟其他病毒的 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 20μL 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×Probe qPCR MasterMix	500μL	0.5mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管
小鼠微小病毒 qPCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 棕色管
小鼠微小病毒 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	50μL	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 162mL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20°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  $45\mu L$  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  $5\mu L 1 \times 10E7$  拷贝/ $\mu L$  的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu L$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入  $5\mu L 1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu L$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E5$  拷贝/ $\mu L$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入  $5\mu L 1 \times 10E5$  拷贝/ $\mu L$  的阳性对照(上步所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E4$  拷贝/ $\mu L$  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  $10\mu L$  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 ( $20\mu L$ 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
小鼠微小病毒 qPCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7μL	不加	不加
超纯水	不加	7μL	不加
第6步所得标准曲线样品稀释液（1-6号）	不加	不加	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°C	5min
PCR 反应 (45 个循环)	95°C	15sec
	60°C	1min (采集 FAM 通道,淬灭基团为 TAMRA)

#### 四、数据处理

**12.** 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。

**13.** 如果阴性对照和阳性对照正常，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。

	<b>15.</b> 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-E10632
<b>说明书</b>	1 份
<b>自备试剂</b>	样品 DNA。
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20°C 保存，有效期 1 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**