



猴痘病毒探针法 qPCR 试剂盒

Monkeypox Virus Probe qPCR Kit

仅

供

科

研

使

用

<h3>产品及特点</h3>	<p>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。</p> <p>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：</p> <ol style="list-style-type: none"> 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/μL。 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 个数量级。 6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法 PCR 反应。 7. 本产品只能用于科研。 																					
<h3>规格及成分</h3>	<table border="1" data-bbox="355 1229 1563 1600"> <thead> <tr> <th>成分</th><th>规格</th><th>包装</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>0.5mL</td><td>0.5mL 本色管</td></tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>1mL</td><td>1.5mL 绿盖管</td></tr> <tr> <td>猴痘病毒 PCR 引物-探针混合液 (含内参探针)</td><td>50 次</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr> <tr> <td>猴痘病毒 PCR 阳性对照(1×10^7 拷贝/μL)</td><td>50μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr> <tr> <td>猴痘病毒 PCR 内参(1×10^4 拷贝/μL)</td><td>250μL</td><td>0.5mL 白盖管</td></tr> <tr> <td>使用手册</td><td>1 份</td><td>无</td></tr> </tbody> </table> <p>本产品采用五孔盒包装</p> <p>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 200μL 超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20°C 保存。</p>	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	1.5mL 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(1×10^7 拷贝/ μL)	50 μL	0.5mL 黄盖管	猴痘病毒 PCR 内参(1×10^4 拷贝/ μL)	250 μL	0.5mL 白盖管	使用手册	1 份	无
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	1.5mL 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(1×10^7 拷贝/ μL)	50 μL	0.5mL 黄盖管																				
猴痘病毒 PCR 内参(1×10^4 拷贝/ μL)	250 μL	0.5mL 白盖管																				
使用手册	1 份	无																				
<h3>使用方法</h3>	<p>一、稀释含内参的标准曲线样品 (以阳性对照 10^1-10^6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度和内参固定在 10^3 拷贝/μL 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)。</p>																					

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 1×10E7 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 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 1×10E6 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 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 1×10E5 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E4 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 10E3 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 MasterMix	各 10μL	10μL	各 10μL
猴痘病毒 PCR 引物-探针混合液(含内参引物)	各 4μL	4μL	各 4μL
N+2 个待测 DNA (含内参)	各 6μL	不加	不加
超纯水	不加	6μL	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 6μL

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	4min
PCR 反应 (45 个循环)	95°C	10sec
	60°C	60sec
	72°C	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

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。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。

13. 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， r^2 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。 14. 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。
PCR 编号	TW-E10243
说明书	1 份
自备试剂	样品 DNA
运输及保存	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