

CAT#:15-47600
低温运输, -20℃保存

BINGENE

JC 病毒探针法荧光定量 PCR 试剂盒

John Cunningham Virus(JCV) Probe qPCR Kit

使用手册 V1.1

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	JC 病毒（ John Cunningham Virus ， JCV ）属于乳多空病毒科（Papovaviridae）多瘤病毒属（Orthopolyomavirus），1971 年从进行性多灶性白质脑病（ progressive multifocal leukoencephalopathy, PML）患者的脑中分离并以该患者名字命名，普通人群血清阳性检测率为 40%~60%，因 AIDS 并发 PML 的患者致死率约为 50%，对于免疫力缺陷和免疫力低下的既往 感染者，还会引起多瘤病毒相关性肾 病（ polyomavirus-associated nephropathy, PVAN）、病毒血症等相关疾病，并与胃癌、肺癌、食管癌等癌症的发生密切相关，但其致病机理尚未阐明。由于目前无特异的预防和治疗方法，因此在病毒感染早期的准确检测对疾病的诊断和治疗十分关键，尤其在免疫低下的人群中实现高效、精准、及时的检测至关重要。本产品就是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测 JC 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，灵敏性高。 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 JC 病毒高度保守区设计，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	编号	五孔盒包装
	2×Probe qPCR MagicMix	190303	500μL（本色盖）
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL（红盖）
	超纯水	100935	1mL（紫盖）
	JC 病毒探针法 qPCR 引物-探针混合液	yp15-47600	150μL（棕色管）
	JC 病毒探针法 qPCR 阳性对照（1×10E7 拷贝/μL）	pd47600	50μL（黄盖）
	使用手册	15-47600sc	1 份
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。		
自备试剂	样品 DNA。		

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以 $10E1-10E6$ 拷贝/ μL 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，最好用带芯枪头，下同。
3. 在 6 号管中加入 $5\mu L$ $1 \times 10E7$ 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E6$ 拷贝/ μL 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/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E5$ 拷贝/ μL 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/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1 \times 10E4$ 拷贝/ μL 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 个样品待提取，最好设置 N+2 个提取，多出的是 PC（样品制备阳性对照）和 NC（样品制备阴性对照）。可以取阳性对照的 10000 倍稀释液 $10\mu L$ 再加上一定量的水，使总体积与待提取样品的规定体积一致，以此作为 PC。另外用水作为 NC。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA，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柱式病毒 DNAout（产品编号：70701-50）。

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（用第 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 N+2 个	PCR 阴性 对照管	标准曲线 样品管 (1-6 管)										
	2×Probe qPCR MagicMix	10μL	10μL	各 10μL										
	JC 病毒探针法 qPCR 引物-探 针混合液	3μL	3μL	各 3μL										
	N+2 个待测 DNA 模板	7μL	-	-										
	超纯水	-	7μL	-										
	第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	-	-	各 7μL (1 号样到 1 号管, 2 号样到 2 号管…)										
	11. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 PCR:													
<table><tr><td>过程</td><td>温度</td><td>时间</td></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>5 min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>95℃</td><td>15sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60sec (采集 FAM 通道的荧 光信号)</td></tr></table>				过程	温度	时间	预变性	95℃	5 min	PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15sec	60℃	60sec (采集 FAM 通道的荧 光信号)
过程	温度	时间												
预变性	95℃	5 min												
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15sec												
	60℃	60sec (采集 FAM 通道的荧 光信号)												
四、数据处理														
12. 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 RNA 浓度的 log 值, 再推算出其浓度。														
13. 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 Ct 必须大于或等于 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。														
关联产品	JC 病毒探针法荧光定量 PCR 试剂盒													

20210929xt