



产品货号: AE80004HU

种 属: 通用

规 格: 25 T

使用说明书

本试剂盒仅能用于科学研究, 不得用于医学诊断。

## 猴痘病毒核酸测定试剂盒 (荧光 PCR 法)

### 【预期应用】

本试剂盒运用荧光 PCR 法对猴痘病毒(monkeypox virus) DNA 进行检测。

使用本试剂盒之前请仔细阅读使用说明书。

### 售前售后服务

我们的专业技术人员可以帮助您解答问题, 以确保客户的满意度。

### 联系我们

Tel: 027-65523378

Fax: 027-65523378

Email: [sales@abebio.com](mailto:sales@abebio.com)  
[service@abebio.com](mailto:service@abebio.com)

Website: [www.abebio.com](http://www.abebio.com)

为了获得高品质的服务, 请准备好提供给我们试剂盒的批号(在外盒标签上)。

### 【试剂盒组成】

试剂名称	数量	体积/人份
核酸抽提液	1 x 1.8 mL	50/100 $\mu$ L
猴痘病毒核酸荧光PCR检测混合液	1 x 950 $\mu$ L	35 $\mu$ L
酶 (Taq + UNG )	1 x 12 $\mu$ L	0.4 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	1 x 400 $\mu$ L	
内部对照品	1 x 30 $\mu$ L	1 $\mu$ L
阳性对照品( $1 \times 10^7$ copies/mL)	1 x 30 $\mu$ L	1 $\mu$ L

说明：不同批号的组分不可以互换使用。

### 【需要而未提供的试剂和器材】

- ※ 适用于 PE5700, MJ-Opticon 等单色荧光 PCR 仪；ABI7000, ABI7300, ABI7500, ABI7900, MJ-chromo4, MX3000P, MX3005P, SmartCycler II, Rotor-Gene6000, Lightcycler R480, iCycleriQ4, iCycleriQ5, Bio-Rad CFX96, SLAN等多色荧光PCR仪及相应软件
- ※ 单道或多道微量加液器及吸头
- ※ 恒温水浴锅或恒温培养箱
- ※ 稀释样本的EP管
- ※ 单色/多色荧光PCR仪
- ※ 薄壁PCR反应管或PCR反应板
- ※ 无菌试管(含1 mL灭菌生理盐水)

### 【试剂盒储存】

未开封的试剂盒	储存在-20°C及以下温度避光保存。请在有效期内使用。	
开封/使用后的 试剂盒	猴痘病毒核酸荧光 PCR检测混合液	储存在-20°C 及以下温度避光保存。 反复冻融不宜超过 3 次。
	核酸抽提液	储存在-20°C及以下温度避光保存。
	酶 (Taq + UNG )	
	H <sub>2</sub> O	
	内部对照品	
阳性对照品 (1×10 <sup>7</sup> copies/mL)		

### 【概述】

猴痘是一种病毒性人畜共患病，人类中出现的症状与过去在天花患者身上所看到的症状相似。但是自 1980 年世界上消灭天花以后，天花已不复存在，而猴痘仍然在非洲部分地区散发。

猴痘发生于非洲中西部雨林中的猴类，也可感染其他动物，偶可使人类受感染。临床表现类似天花，但病情较轻。这种疾病由猴痘病毒造成，它属于一个包括天花病毒，并在天花疫苗中采用的病毒和牛痘病毒的病毒组，但需与天花、水痘相鉴别。这种病毒可以通过直接密切接触由动物传染给人，也可以在人与人之间传播。传染途径主要包括血液和体液。但是，猴痘的传染性远逊于天花病毒。

2022 年猴痘疫情最先被英国在当地时间 2022 年 5 月 7 日发现。世界卫生组织近期连续报道，已超 12 个国家报告累计报道近百例猴痘病毒病例，包括英国、加拿大、西班牙、葡萄牙、美国、德国、意大利、刚果(金)、尼日利亚、喀麦隆、中非共和国、澳大利亚。研究人员通过基因组测序，猴痘病毒主要有两个系统发育上不同的分支：中非（刚果盆地）分支和西非分支。这次在欧洲确诊的病例是由该病毒西非分支引起的，其危险性低于刚果盆地分支。

### 【实验原理】

本试剂盒采用聚合酶链式反应(PCR)结合Taqman技术，对猴痘病毒(Monkeypox Virus)的特异性DNA核酸片段进行荧光PCR检测。

### 【检测范围】

$1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$  copies/mL。

### 【最低检测限】

$5 \times 10^3$  copies/mL。

### 【样本的采集及储存】

- **血液** 可用抗凝剂(非肝素)采集新鲜样本，样本采集后30分钟内于2 - 8°C 1000 x g离心15分钟，取上清即可立即检测。
- **皮疹渗出液** 用无菌拭子拭取皮疹渗出液，置入无菌试管(含1 mL灭菌生理盐水)，用无菌棉球将试管塞紧后，密闭送检，样本可立即用于测试。

### 【样本处理及试剂配制】

使用前将所有的试剂和样本缓慢平衡至室温(20-25°C)。

**样本、对照品的核酸裂解处理** 取50  $\mu$ L 样本，加50  $\mu$ L 核酸提取液，振荡10秒，99°C 干浴或水浴10分钟，13000 rpm 离心10分钟，保留上清备用。

**H2O** 作为阴性对照。如进行定量检测，阳性对照品需要进行10倍、100倍、1000倍梯度稀释。

**试剂配制** 取 $n \times 35$   $\mu$ L猴痘病毒核酸荧光PCR检测混合液与 $n \times 1$   $\mu$ L内部对照品，以及 $n \times 0.4$   $\mu$ L酶 (Taq + UNG) ( $n$ 为反应管数)，振荡混匀数秒，3000 rpm离心数秒。(备注：如不使用内部对照品，可用  $n \times 1$   $\mu$ L的H2O代替补足。)

### 【操作步骤】

实验开始前，请提前配置好所有试剂，试剂或样本稀释时，均需混匀，混匀时尽量避免起气泡。

1. **加样** 取上述混合液36  $\mu$ L 置于薄壁 PCR 反应管或 PCR 反应板中，然后将已处理样本、阳性对照品、H2O 各 4  $\mu$ L 分别加入薄壁 PCR 反应管或

PCR 反应板中，盖好薄壁 PCR 反应管盖或 PCR 反应板膜，立即进行 PCR 扩增反应。

- PCR 扩增** 反应管置于定量荧光 PCR 仪上，推荐循环参数设置：37°C × 2 min；94°C × 2 min；再按93°C × 15s→60°C × 60s，循环40次；单点荧光检测在60°C。反应体系为40 μL。

**荧光通道检测选择：**选用 FAM 和 HEX(或 VIC/JOE)通道。

**备注：**如使用 ABI 系列 PCR 仪，请务必于 passive reference 和 quencher 处均选择“none”。

- 基线和阈值设定** 基线调整取6-15个循环的荧光信号，阈值设定原则以阈值线刚好超过 H<sub>2</sub>O 检测荧光曲线的最高点。
- 校准程序** 进行定量检测时需要进行校准程序，阳性对照品处理和加样在**样本、对照品的核酸裂解处理和加样**中已经说明；实验结束后将阳性对照品浓度输入仪器软件中，仪器自动生成标准曲线。
- 质量控制** 试剂盒各对照品须达到以下要求，否则实验视为无效。

	FAM通道Ct值(目的基因)	HEX或VIC/JOE通道Ct值 (内部对照品)
H <sub>2</sub> O	UNDET或40	25~35
阳性对照品	≤35	--
标准曲线 (如有)	相关系数应≤-0.98	

### 【试验结果的判断】

序号	通道	Ct值	结果判断
1	FAM	UNDET或40	样本低于检测限，报告为阴性
2	FAM	≤38	报告为阳性
3	FAM	38~40	复检一次，如仍为38~40，则报告为阴性

进行定量检测时，仪器生成标准曲线后，自动显示待检样品定量值。

### 【参考值范围】

阴性 (检测对象猴痘病毒为病原微生物, 在健康人体中不存在)。

### 【对检验结果的解释】

实验室环境污染, 试剂污染, 样品交叉污染会出现假阳性结果; 试剂运输, 保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降, 出现假阴性或定量检测不准确的结果。内部对照品 HEX(或 VIC/JOE)通道显示 UNDET 表明 PCR 反应受到抑制。

### 【检验方法的局限性】

当检测样本中被检核酸浓度含量低于最低检测限  $5 \times 10^3$  copies/mL 时可能会发生假阴性的结果。

### 【注意事项】

1. 本试剂盒有效期: 12个月。本试剂盒务必在有效期内使用。
2. 本试剂盒仅能用于科学研究, 不得用于医学诊断。
3. 整个检测过程应严格分在三区进行: PCR 反应体系的配制区; 样本处理、加样区; PCR 扩增、荧光检测及结果分析区。各区使用的仪器、设备、耗材和工作服应独立专用。实验后即请清洁工作台, 并进行消毒。
4. 使用不含荧光物质的一次性手套(经常替换)、一次性专用离心管、自卸式移液器和带滤嘴吸头。
5. 试剂准备和样本处理应使用超净工作台(负压式)或防污染罩, 以防止对环境污染。
6. 每次实验应设置阴、阳性对照品。
7. 操作人员应经过专业培训, 具有一定经验和操作技能。
8. 操作台、移液器、离心机、PCR 扩增仪等仪器设备应经常用10%次氯酸或75%酒精、紫外线灯或臭氧消毒处理。
9. 实验中接触过标准品和对照品的废弃物(如吸头)、扩增完毕的离心管、样本等应进行无害化处理后方可丢弃。
10. 试剂使用前应在常温下充分融化并混匀。
11. PCR反应混合液应避光保存。
12. 反应管中尽量避免气泡存在, 管盖需盖紧。
13. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境密

切相关，请务必准备充足的样本备份。

14. 只有全部使用本试剂盒配套试剂才能保证检测结果，不能混合或者替代不同批次或者不同厂家的试剂。只有严格遵守本试剂盒的实验说明才会得到最佳的检测结果。
15. 在储存及温育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须盖紧以防止蒸发和微生物的污染。
16. 由于操作者不熟练、操作失误或者读数仪器程序选用错误等有可能导致错误结果。请使用者详读使用说明书。
17. 由于现有条件及科学技术水平尚不能对所有供货商提供的所有原料进行全面的鉴定和分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。

#### **【参考文献】**

- [1] Hermann Meyer, Mathilde Perrichot, Markus Stemmler, Petra Emmerich, Herbert Schmitz, Francis Varaine, Outbreaks of Disease Suspected of Being Due to Human Monkeypox Virus Infection in the Democratic Republic of Congo in 2001 J. Clin. Microbiol., Aug 2002; 40: 2919 - 2921.
- [2] CHRISTINA L. et al.. REGNERY MONKEYPOX ZONOTIC ASSOCIATIONS: INSIGHTS FROM LABORATORY EVALUATION OF ANIMALS ASSOCIATED WITH THE MULTI-STATE US OUTBREAK Am J Trop Med Hyg, Apr 2007; 76: 757-768.
- [3] Kurt D. Reed, John W. Melski, Mary Beth Graham, Russell L. Regnery, Mark J. Sotir, Mark V. Foldy, Jeffrey P. Davis, and Inger K. Damon The Detection of Monkeypox in Humans in the Western Hemisphere N. Engl. J. Med., Jan 2004; 350: 342 - 350
- [4] LYNNE A. et al. EXTENDED INTERHUMAN TRANSMISSION OF MONKEYPOX IN A HOSPITAL COMMUNITY IN THE REPUBLIC OF THE CONGO, 2003 Am J Trop Med Hyg, Aug 2005; 73: 428-434.

