|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:14-18610****低温运输，-20℃保存** |  |
| **杜氏利什曼虫(黑热病病原虫)染料法荧光定量PCR试剂盒** ***Leishmania donovani* SYBR qPCR Kit** |
| **使用手册V1.0** |
| **北京克必隆分子诊断技术有限公司****网址：[www.bingene.com](http://www.tiandz.com)；电话：400-6005850；电邮：order@bingene.com** |
| **产品及特点** | 利什曼原虫是一种胞内寄生原虫，由媒介昆虫白蛉传播。寄生人体的利什曼原虫主要有杜氏利什曼原虫、硕大利什曼原虫、墨西哥利什曼原虫、巴西利什曼原虫等，其中，杜氏利什曼原虫引起的黑热病症状最重，致死率极高。本公司开发了杜氏利什曼虫基因染料法荧光定量PCR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. 引物经过优化，灵敏性高，分析灵敏度可以达到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，引物是根据利什曼原虫高度保守区设计，不会跟其他生物的DNA发生交叉反应。
5. 本产品足够50次20μL体系的染料法荧光定量PCR反应。
6. 既可用于定性，也可用于定量。用于定量时线性范围至少5个数量级。
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×qPCR MagicMix | 90408 | 500μL（棕色管） |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 180701 | 1mL（红盖） |
| 超纯水 | 100935 | 1mL（紫盖） |
| 杜氏利什曼虫染料法qPCR引物混合液 | yw14-18610 | 100μL（白盖） |
| 杜氏利什曼虫染料法qPCR阳性对照(1×10E7拷贝/μL) | pc18610 | 50μL（黄盖） |
| 使用手册 | 14-18610sc | 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、制备标准曲线样品**（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45μL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5μL 阳性对照（其浓度为1×10E7拷贝/μL，试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得1×10E6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5μL 1×10E6拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E5拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在5号管中加入5μL 1×10E5拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E4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**1. 用自选方法纯化样品的DNA，本产品跟市场上绝大多数核酸纯化产品兼容。
2. 如果有N个样品，则需要进行N+2个样品提取，多出的一个用作样品制备阳性对照管、另一个用作样品制备阴性对照管。

**三、设置qPCR反应（20μL体系，在样品制备室进行）**1. 如果进行定量分析，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，6个用于标准曲线样品。如果做定性分析，则6个标准曲线样品只选一个做（可以选4号，其余样品不变）。以下只介绍定量分析的反应设置。
2. 在标记管中按下表加入各成分：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **成分** | **N+2个****样品管** | **PCR阴性对照管** | **标准曲线****样品管（2-7管）** |
| 2×qPCR MagicMix | 10μL | 10μL | 各10μL |
| 杜氏利什曼虫染料法 qPCR引物混合液 | 2μL | 2μL | 各2μL |
|  N+2个待测样品DNA模板 | 8μL | - | - |
| 自备超纯水 | - | 8μL | - |
| 第7步所得标准曲线样品稀释液（1-6号） | - | - | 各8μL（1号样到1号管，2号样到2号管…） |

1. 盖上盖子后上机，按下面参数进行PCR（具体PCR参数可以根据仪器不同而自行优化）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **过程** | **温度** | **时间** |
| 预变性 | 95℃ | 5 min |
| PCR反应（40个循环） | 95℃ | 15 sec |
| 60℃ | 1 min（采集SYBR通道的荧光信号） |
| 按仪器预设程序进行熔解曲线分析 |

**四、数据处理**1. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有Ct值，但Tm值跟阳性对照Tm不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，数据无效，不予以分析。Tm跟阳性对照Tm一致的，为有效Ct。
2. 如果两种阴性对照的溶解曲线所得Tm值跟阳性对照的Tm值一样，说明环境或试剂可能有过去的PCR扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。
3. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和PCR阴性对照）是假阳性，可以继续分析其它样品有效数据。
4. 对定量检测，以阳性对照样品的浓度的log值为横轴，以有效Ct值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效Ct值从标准曲线上推算出样品DNA浓度的log值，再换算出待测样品的DNA浓度。
5. 对定性检测，则有有效Ct值的为阳性，无有效Ct值的为阴性。
 |
| **关联产品** | 杜氏利什曼虫染料法荧光定量PCR试剂盒 |

20210929xt