

天
净
沙
系
列

CAT#:14-18610
低温运输, -20℃保存

BINGENE

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; 电话: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

<p>产品及特点</p>	<p>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：</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。 																							
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>五孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2\timesqPCR MagicMix</td> <td>90408</td> <td>500μL (棕色管)</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>180701</td> <td>1mL (红盖)</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>100935</td> <td>1mL (紫盖)</td> </tr> <tr> <td>杜氏利什曼虫染料法 qPCR 引物混合液</td> <td>yw14-18610</td> <td>100μL (白盖)</td> </tr> <tr> <td>杜氏利什曼虫染料法 qPCR 阳性对照(1\times10E7 拷贝/μL)</td> <td>pc18610</td> <td>50μL (黄盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>14-18610sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	五孔盒包装	2 \times qPCR MagicMix	90408	500 μ L (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	100 μ L (白盖)	杜氏利什曼虫染料法 qPCR 阳性对照(1 \times 10E7 拷贝/ μ L)	pc18610	50 μ L (黄盖)	使用手册	14-18610sc	1 份
成分	编号	五孔盒包装																						
2 \times qPCR MagicMix	90408	500 μ L (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	100 μ L (白盖)																						
杜氏利什曼虫染料法 qPCR 阳性对照(1 \times 10E7 拷贝/ μ L)	pc18610	50 μ L (黄盖)																						
使用手册	14-18610sc	1 份																						
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20$^{\circ}$C 保存，保存期限为 12 个月。</p>																							
<p>自备试剂</p>	<p>样品 DNA。</p>																							
<p>使用方法</p>	<p>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。</p> <ol style="list-style-type: none"> 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\times10E7 拷贝/μL,试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1\times10E6 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\times10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所 																							

得),充分震荡 1 分钟,得 1×10^5 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 $5\mu\text{L}$ 1×10^5 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1×10^4 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. 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。

8. 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 (20 μL 体系,在样品制备室进行)

9. 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。

10. 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 \times qPCR MagicMix	10 μL	10 μL	各 10 μL
杜氏利什曼虫染料法 qPCR 引物混合液	2 μL	2 μL	各 2 μL
N+2 个待测样品 DNA 模板	8 μL	-	-
自备超纯水	-	8 μL	-
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	-	-	各 8 μL (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 (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 $^{\circ}\text{C}$	5 min
PCR 反应 (40 个循环)	95 $^{\circ}\text{C}$	15 sec
	60 $^{\circ}\text{C}$	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

12. 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

	<p>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。T_m 跟阳性对照 T_m 一致的，为有效 Ct。</p> <p>13. 如果两种阴性对照的溶解曲线所得 T_m 值跟阳性对照的 T_m 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。</p> <p>14. 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。</p> <p>15. 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。</p> <p>16. 对定性检测，则有有效 Ct 值的为阳性，无有效 Ct 值的为阴性。</p>
<p>关联产品</p>	<p>杜氏利什曼虫染料法荧光定量 PCR 试剂盒</p>