

天
净
沙
系
列

CAT#:15-32400

低温运输, -20℃保存

BINGENE

巴贝斯属通用探针法 qPCR 试剂盒

使用手册 V1.0

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	巴贝斯虫属 (<i>Babesia</i> spp.) 主要是通过蜱虫传播寄生于动物宿主红细胞内的原虫，它主要引起人和动物的巴贝虫病，属于人兽共染的寄生虫病。人巴贝虫病，急性发病时颇似疟疾，临床以间歇热、脾大、黄疸及溶血等为特征。目前已经有 100 种以上的巴贝斯虫得到鉴定，是人和动物健康的重大威胁，因此快速检测巴贝斯虫具有重要的意义。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巴贝斯虫的通用的试剂盒，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，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/μL。 3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。 4. 特异性高，引物是根据巴贝斯属通用 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。 5. In silico 分析发现本产品可以检测 <i>B. venatorum</i>、<i>B. divergens</i>、<i>B. capreoli</i> 和 <i>B. canis</i> 等大巴贝斯，但不能检测 <i>B. microti</i>。 6. 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。 7. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。 8. 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	0.5 mL (本色盖)
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (黄盖)
	超纯水	100935	1 mL (蓝盖)
	巴贝斯属通用 qPCR 引物-探针混合液	yp15-32400	150 μL (棕色管)
	巴贝斯属通用 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc32400-L42863	50 μL (红盖)
	使用手册	15-32400sc	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 μL 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 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(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 5 μL 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 4 号管中加入 5 μL 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

- 7. 如果有 N 个样品，最好设置 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 10μL 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。
- 8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品 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（20μL 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（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。
- 10. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一 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	PCR 阴性	标准曲线样品管
----	-----	--------	---------

	N+2 个	对照	(1-6 管)
2×Probe qPCR MagicMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
巴贝斯属通用 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加
超纯水	不加	7 μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7μL (2 号样 到 2 号管, 3 号 样到 3 号管…)

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℃	10 min
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	10 sec
	60℃	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 设置 TAMRA 为淬灭基团)

五、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 DNA 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，则阴性对照必须无 Ct。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，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 则为阴性，如果 Ct 小于 35 则为阳性，如果在 35-40 之间，则重复一次。重复实验的 Ct 值如果小于 40，则为阳性，如果无 Ct 则判为阴性。

关联产品	巴贝斯属通用荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒
------	-------------------------