

## 吉氏巴贝斯虫探针法荧光定量 PCR 试剂盒

本产品仅供体外研究使用,不得用于临床诊断

咨询QQ: 2881498726

订购热线: 021-54720761

咨询电话: 13166274223(微信同号)

### 产品及特点:

吉氏巴贝斯虫 (*Babesia gibsoni*) 是巴贝斯科、巴贝斯属微生物。形态多样, 典型虫体呈圆点形、弓形或小杆形。吉氏巴贝斯虫由于蜱虫传播, 寄生于犬的红细胞内, 破坏其红细胞导致贫血, 还有可能引起溶血、血小板减少、肝脏损伤等等一系列严重并发症, 好在毛毛只是轻度溶血及血小板减少。其潜伏期是 7-21天。常呈慢性感染, 表现亚临床症状。因此快速灵敏检测吉氏巴贝斯虫具有重要意义。

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吉氏巴贝斯虫的试剂盒。

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, 引物是根据吉氏巴贝斯虫高度保守区设计, 不会跟其他病毒 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
6. 本产品只能用于科研。

## 规格及成分:

编号	成分	规格
试剂一	2 × Probe qPCR MagicMix	500μL (本色盖)
试剂三	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL (黄盖)
试剂二	吉氏巴贝斯虫 qPCR 引物混合液	100μL (白盖)
试剂四	吉氏巴贝斯虫 qPCR 探针	50μL (棕色管)
试剂五	吉氏巴贝斯虫探针法 qPCR 阳性对照( $1 \times 10^8/\mu\text{L}$ )	50μL (红盖)
	使用手册	1份

## 运输及保存:

低温运输， $-20^{\circ}\text{C}$ 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 $10^2$ - $10^7$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ 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 7, 6, 5, 4, 3, 2。
2. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu\text{L}$  荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同)。
3. 在 7 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。

5. 换枪头, 在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。

6. 放冰上待用。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 10 $\mu\text{L}$  阳性对照的 10000 倍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 DNA 提取试剂盒兼容。

## 三、Probe qPCR 反应 (20 $\mu\text{L}$ 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):

成份	N+2 个 样品管	PCR 阴性 对照管	标准曲线 样品管 (2-7 管)
2 $\times$ Probe qPCR MagicMix	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	各 10 $\mu\text{L}$
吉氏巴贝斯虫 qPCR 探针	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	各 1 $\mu\text{L}$
吉氏巴贝斯虫针法 qPCR 引物混合液	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	各 2 $\mu\text{L}$
N+2 个待测 DNA 模板	7 $\mu\text{L}$	--	--
超纯水	--	7 $\mu\text{L}$	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)	--	--	各 7 $\mu\text{L}$ (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°C	3 min
PCR 反应 40 个循环	95°C	15 sec
	60°C	1 min (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 30。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。若重复结果 Ct 值小于 40，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，

否则为阴性。

**所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。**