

上海通蔚

TW—reagent.com 上海通蔚

# 中华枝睾吸虫探针法 qPCR 试剂盒

Clonorchis sinensis Probe PCR Kit

仅

供

科

研

使

用

**产品及特点**

中华枝睾吸虫 (Clonorchis sinensis) 的成虫正常情况下寄生在犬、猫或人等哺乳动物终宿主的肝胆管内, 成虫主要侵袭宿主肝脏, 所以, 中华支睾吸虫俗称“肝吸虫”。中华支睾吸虫囊蚴侵入犬、猫或人等哺乳动物终宿主体内后仅需 20 天左右便可发育为成虫, 引起肝脏、胃肠道的损伤, 进而导致肝胆疾病、胃肠道紊乱以及细菌的混合感染等, 给人类和动物健康造成极大危害。因此中华枝睾吸虫的快速检测具有重要意义, 为此本公司以探针法 qPCR 技术为基础开发了中华枝睾吸虫的检测试剂盒, **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, 灵敏度高, 低检测限可达 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, 引物是根据中华枝睾吸虫基因组 DNA 高度保守区设计, 不会跟其它生物的 DNA 发生交叉反应。
5. 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 5 个数量级。
6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
7. 本产品只能用于科研。

**规格及成分**

成分	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	0.5mL	0.5mL 本色管
荧光 PCR 模板专用稀释	1mL	1.5mL 绿盖管
超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管
中华枝睾吸虫 qPCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 棕色管
中华枝睾吸虫阳性对照(1E7 拷贝/μL)	50μL	0.5mL 黄盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用五孔盒包装		
<p><b>注意:</b> 引物-探针干粉在使用前需要短暂离心, 然后在离心管中加入 165μL 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20℃保存。</p>		

**一、稀释标准曲线样品** (以 1E1-1E6 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。本产品不提供活体样品做阳性对照, 只提供 DNA 片段作为阳性

**使用方法**

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  $\mu\text{L}$  荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头（下同）。
3. 在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E7 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡混匀 1 分钟，得到 1E6 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E6 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡混匀 1 分钟，得到 1E5 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E5 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步所得)，充分震荡混匀 1 分钟，得到 1E4 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 依次重复上面的操作得到 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，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  $\mu\text{L}$  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 (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（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加）：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照管	标准曲线样品管 (1-6 管)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10μL	10μL	各 10μL
中华枝睾吸虫 qPCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7μL	不加	不加
超纯水	不加	7μL	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

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℃	5min
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15sec
	60℃	1min (采集 FAM 通道, 淬灭基团为 TAMRA)

#### 四、数据处理

12. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性, 则整个扩增或制备实验无效, 不需要分析数据, 需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性, 说明环境污染, 则整个扩增或制备实验无效, 不需要分析数据, 需要跟厂家联系, 购买新的引物和探针。

13. 如果阴性对照和阳性对照正常, 则实验有效, 可以进入后续分析。

14. 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。

15. 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 或 Ct 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 40, 否则实验无效。如果实验有效, 则分析待测样品, 如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 40, 则为阴性。如果 Ct 小于 40 则为阳性。

PCR 编号

TW-E11316

<b>说明书</b>	1 份
<b>自备试剂</b>	超纯水, 样品 DNA
<b>运输及保存</b>	低温运输, -20°C保存, 有效期 2 年

**生产企业: 上海通蔚实业有限公司**

**公司地址: 上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603**

**公司电话: 021-54845833**

**技术支持: 15800441009**