



## 巴贝斯属通用探针法 qPCR 试剂盒

**Babesia sppProbe qPCR Kit**

货号: JLC\_Y7011

使

用

说

明

书

## 产品及特点

巴贝斯虫属 (*Babesia* 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, 分析灵敏度高, 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 *B. venatorum*、*B. divergens*、*B. capreoli* 和 *B. canis* 等大巴贝斯, 但不能检测 *B. microti*。
6. 既用于定性检测, 又用于定量检测。定量检测时线性范围至少 5 个数量级。
7. 本产品足够 50 次 20  $\mu$ L 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                                                                              | 规格         | 包装        |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------|
| 2×Probe qPCR MasterMix                                                          | 0.5mL      | 0.5mL 本色盖 |
| 荧光 PCR 专用模板稀释液                                                                  | 1mL        | 1.5mL 绿盖管 |
| 超纯水                                                                             | 1mL        | 1.5mL 蓝盖管 |
| 巴贝斯属通用 qPCR 引物-探针干粉                                                             | 50 次       | 1.5mL 棕色管 |
| 巴贝斯属通用 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/ $\mu$ L)                                               | 50 $\mu$ L | 0.5mL 黄盖管 |
| 使用手册                                                                            | 1 份        | 无         |
| 本产品采用五孔盒包装                                                                      |            |           |
| <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 165 $\mu$ L 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要-20℃保存。 |            |           |

**一、稀释标准曲线样品** (以 1E1-1E6 拷贝/ $\mu$ 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

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div>使用方法</div> | <p>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"><li>1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。</li><li>2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头，下同。</li><li>3. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。</li><li>4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。</li><li>5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E4 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。</li><li>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。</li></ol> <p><b>二、样品 DNA 的制备</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>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 μL 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。</li><li>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。</li></ol> <p><b>三、Probe qPCR 反应(20μL 体系，在样品制备室进行)</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>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。</li><li>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</li></ol> |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

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<br>N+2 个 | PCR<br>阴性对照管 | 标准曲线样品管<br>(1-6 管) |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| 2×Probe qPCR MasterMix  | 各 10μL       | 10μL         | 各 10μL             |
| 巴贝斯属通用 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<br>(40 个循环) | 95℃ | 15sec                              |
|                    | 60℃ | 60sec（采集 FAM 通道的荧光信号，设置 BHQ 为淬灭基团） |

四、数据处理

12. 如果样本制备阳性对照或 PCR 阳性对照(包括标曲样本)结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据，需要重新样本制备，重新进行 PCR 扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或 PCR 阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系。
13. 如果阴性对照和阳性对照均正常，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。 |
| <b>自备试剂</b>  | 样品 DNA。                                              |
| <b>运输及保存</b> | 低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。                                 |

**生产企业：上海机纯实业有限公司**

**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：021-54720761**

**技术支持：13166274223**