



## 伊氏锥虫探针法荧光定量 PCR 试剂盒

### 产品及特点:

伊氏锥虫病又称“苏拉病”，是由伊氏锥虫（*Trypanosoma evansi*）引起的一种血液原虫病，多发于热带和亚热带地区。OIE 将其列为 B 类疫病。伊氏锥虫病潜伏期为 4~11 天。急性病例多为不典型的稽留热(多在 40℃以上)或弛张热。发热期间，呼吸急促，脉搏增数，血像、尿液、精神、食欲、体质等均有明显新变化。一般在发热初期血中可检出锥虫，急性病例血中锥虫检出率与体温升高比较一致，而且有虫期长，慢性病例不规律，常见体躯下部浮肿。因此快速灵敏检测伊氏锥虫具有重要意义。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伊氏锥虫的试剂盒。

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，引物是根据伊氏锥虫高度保守区设计，不会跟其他病毒 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20μL 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               | 1 mL(黄盖)   |
| 试剂二 | 伊氏锥虫 qPCR 引物混合液              | 100μL(白盖)  |
| 试剂四 | 伊氏锥虫 qPCR 探针                 | 50μL(棕色管)  |
| 试剂五 | 伊氏锥虫探针法 qPCR 阳性对照(1×10E8/μL) | 50μL(红盖)   |
|     | 使用手册                         | 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 $10E2$ - $10E7$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L  $1 \times 10E8$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E7$  拷贝/ $\mu$ 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  $\mu$ L  $1 \times 10E7$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu$ 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  $\mu$ L  $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E5$  拷贝/ $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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后再才设置阳性对照, 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 $\times$ ProbeqPCRMagicMix | 10 $\mu$ L | 10 $\mu$ L | 各 10 $\mu$ L                        |
| 伊氏锥虫 qPCR 探针                 | 1 $\mu$ L  | 1 $\mu$ L  | 各 1 $\mu$ L                         |
| 伊氏锥虫探针法 qPCR 引物混合液           | 2 $\mu$ L  | 2 $\mu$ L  | 各 2 $\mu$ L                         |
| N+2 个待测 DNA 模板               | 7 $\mu$ L  | --         | --                                  |
| 超纯水                          | --         | 7 $\mu$ L  | --                                  |
| 第 7 步所得标准曲线样品稀释液(2-7 号)      | --         | --         | 各 7 $\mu$ 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 $^{\circ}$ C | 3min                 |
| PCR 反应 40 个循环 | 95 $^{\circ}$ C | 15sec                |
|               | 60 $^{\circ}$ C | 1min(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。

**上海纪宁实业有限公司([www.shjning.com](http://www.shjning.com))所有产品仅供科研使用, 不得用于其他用途。**