

无形体属通用探针法 qPCR 试剂盒

Anaplasma spp. Probe qPCR Kit

CAT#: BN61121

低温运输, -20℃保存

产品及特点	无形体（Anaplasma, 又叫无浆体）几乎没有细胞浆，呈致密的、均匀的圆形结构，姬姆萨染色呈紫红色。它引起反刍动物无形体病(Anaplasmosis)。该病是一种慢性和急性传染病，其特征为高热、贫血、消瘦、黄疸和胆囊肿大。本病呈世界性分布。由于该病是一种寄生于细胞内的寄生菌，主要通过蜱（也叫壁虱）叮咬传播。该病临床症状与某些病毒性疾病相似，容易发生误诊，严重者可导致死亡。因此快速灵敏诊断无形体具有重要意义。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无形体的试剂盒，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，引物是根据无形体 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 分析本产品可以检测边缘无形体（<i>A. marginale</i>）、中央无形体(<i>A. centrale</i>)和绵羊无形体(<i>A. ovis</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 20 μL 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	包装
		2×Probe qPCR MagicMix	60001	0.5 mL
		荧光 PCR 专用模板稀释液	60002	1 mL
		超纯水	60003	1 mL
		无形体属通用 qPCR 引物-探针混合液	61121-4	150 μL
		无形体属通用 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	61121-5	50 μL
		使用手册		1 份

本产品仅用于科研

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 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。 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 μL 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最后加）：

		<table><tr><th>成分</th><th>样品管 N+2 个</th><th>PCR 阴性对 照</th><th>标准曲线样品 管 (1-6 管)</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MagicMix</td><td>各 10 μL</td><td>10 μL</td><td>各 10 μL</td></tr><tr><td>无形体通用 qPCR 引物-探针混合液</td><td>各 3 μL</td><td>3 μL</td><td>各 3 μL</td></tr><tr><td>N+2 个待测 DNA 样本</td><td>各 7 μL</td><td>不加</td><td>不加</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>不加</td><td>7 μL</td><td>不加</td></tr><tr><td>第 6 步所得标准曲线样品稀释 液（1-6 号）</td><td>不加</td><td>不加</td><td>各 7 μL（2 号样 到 2 号管，3 号 样到 3 号管…）</td></tr></table>	成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对 照	标准曲线样品 管 (1-6 管)	2×Probe qPCR MagicMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL	无形体通用 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 7 μL（2 号样 到 2 号管，3 号 样到 3 号管…）
	成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对 照	标准曲线样品 管 (1-6 管)																						
	2×Probe qPCR MagicMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL																						
	无形体通用 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 7 μL（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：																									
	<table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>10 min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 （45 个循环）</td><td>95℃</td><td>15 sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60 sec（采集 FAM 通道的荧光信号，TAMRA 为淬灭基团）</td></tr></table>			过程	温度	时间	预变性	95℃	10 min	PCR 反应 （45 个循环）	95℃	15 sec	60℃	60 sec（采集 FAM 通道的荧光信号，TAMRA 为淬灭基团）												
	过程	温度	时间																							
预变性	95℃	10 min																								
PCR 反应 （45 个循环）	95℃	15 sec																								
	60℃	60 sec（采集 FAM 通道的荧光信号，TAMRA 为淬灭基团）																								
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 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 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 35。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。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性，如果小于 40，则为阳性。																										
关联产品	无形体荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒																									