

基孔肯雅热病毒/登革热病毒/寨卡病毒三

重探针法 PCR 试剂盒

CHIKV/DENV/ZIKV Triplex Probe PCR Kit

CAT#:BN66046

低温运输, -20℃保存

产品及特点	本产品以探针法 qPCR 技术为基础开发了基孔肯雅热病毒/登革热病毒/寨卡病毒三重的检测试剂盒。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, 分析灵敏性高, 可以达到 100 拷贝/反应。 3. 提供阳性对照, 便于排除假阴性结果。 4. 特异性高, 引物和探针分别根据 CHIKV/DENV/ZIKV 高度保守区设计, 不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。 5. 本产品只用于定性检测, 不推荐用于定量检测。 6. CHIKV/DENV/ZIKV 分别用 Cy5、HEX 和 FAM 标记的三个探针检测。 7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 qPCR 反应。 8. 本产品只能用于科研。			
规格及成分		成分	编号	规格
		2 $\times$ Probe qPCR MasterMix	60001	500 μ L
		荧光 PCR 专用模板稀释液	60002	1 mL
		CHIKV/DENV/ZIKV 三重 PCR 引物-探针干粉	66046-3	50 次
		CHIKV 阳性对照 (1E4 拷贝/ μ L)	66046-4	50 μ L
		DENV 阳性对照 (1E4 拷贝/ μ L)	66046-5	50 μ L
		ZIKV 阳性对照 (1E4 拷贝/ μ L)	66046-6	50 μ L
		使用手册		1 份

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

	注意：在使用前需要短暂离心引物-探针干粉管，然后在离心管中加入 165 μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。																																																
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、样品 DNA 的制备																																																
	1. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是样本制备 PC（阳性对照），一个是样本制备 NC（阴性对照）。可以用自备的、确定三个基因为阳性的样本作为样品制备 PC。可以用自备的、确定是阴性的样本作为样品制备 NC，可以用水替代。																																																
	2. 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。																																																
	二、Probe PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）																																																
	3. 如果有 N+2 个核酸提取，则设置 N+6 个 PCR 反应，多出的 4 个 1 个用于 PCR NC，另外三个分别用于三个待检测基因的 PCR PC。在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复）：																																																
	<table><tr><th>成分</th><th>样品管 N+2 个</th><th>PCR NC</th><th>CHIKV PC</th><th>DENV PC</th><th>ZIKV PC</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>各 10 μL</td><td>10 μL</td><td>10 μL</td><td>10 μL</td><td>10 μL</td></tr><tr><td>CHIKV/DENV/ZIKV 三重 PCR 引物-探针溶液</td><td>各 3 μL</td><td>3 μL</td><td>3 μL</td><td>3 μL</td><td>3 μL</td></tr><tr><td>N+2 个待测 DNA</td><td>各 7 μL</td><td>不加</td><td>不加</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><td>不加</td><td>不加</td></tr><tr><td>CHIKV 阳性对照（1E4 拷贝/μL）</td><td>不加</td><td>不加</td><td>7 μL</td><td>不加</td><td>不加</td></tr><tr><td>DENV 阳性对照（1E4 拷贝/μL）</td><td>不加</td><td>不加</td><td>不加</td><td>7 μL</td><td>不加</td></tr><tr><td>ZIKV 阳性对照（1E4 拷贝/μL）</td><td>不加</td><td>不加</td><td>不加</td><td>不加</td><td>7 μL</td></tr></table>	成分	样品管 N+2 个	PCR NC	CHIKV PC	DENV PC	ZIKV PC	2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	CHIKV/DENV/ZIKV 三重 PCR 引物-探针溶液	各 3 μL	3 μL	3 μL	3 μL	3 μL	N+2 个待测 DNA	各 7 μL	不加	不加	不加	不加	超纯水	不加	7 μL	不加	不加	不加	CHIKV 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	7 μL	不加	不加	DENV 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	不加	7 μL	不加	ZIKV 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	不加	不加	7 μL
	成分	样品管 N+2 个	PCR NC	CHIKV PC	DENV PC	ZIKV PC																																											
	2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL																																											
	CHIKV/DENV/ZIKV 三重 PCR 引物-探针溶液	各 3 μL	3 μL	3 μL	3 μL	3 μL																																											
	N+2 个待测 DNA	各 7 μL	不加	不加	不加	不加																																											
超纯水	不加	7 μL	不加	不加	不加																																												
CHIKV 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	7 μL	不加	不加																																												
DENV 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	不加	7 μL	不加																																												
ZIKV 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	不加	不加	7 μL																																												
4. 盖上盖子上机，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>PCR 反应</td><td>94℃</td><td>30 sec</td></tr></table>	过程	温度	时间	预变性	95℃	10 min	PCR 反应	94℃	30 sec																																								
过程	温度	时间																																															
预变性	95℃	10 min																																															
PCR 反应	94℃	30 sec																																															

(45 个循环)	55℃	15 sec
	72℃	60 sec (采集 FAM 通道、HEX 通道和 Cy5 通道的荧光信号, 淬灭基团均为 TAMRA)

注意: 循环次数不要超过 45 个循环

三、数据分析

5. 原始数据分析。如果 FAM 通道、HEX 通道和 Cy5 通道的 Ct 大于或等于 40, 或者没有 Ct 值, 则判为该通道阴性。如果 Ct 小于 40, 并且荧光信号呈现倒 S 的典型扩增曲线, 则判断为该通道阳性。
6. 实验有效性分析:
 - 6.1、PC: 所有 PC 反应应该在对应的通道呈现阳性, 如 CHIKV PC 应该为 Cy5 通道阳性, DENV PC 应该为 HEX 通道阳性。如果样本制备 PC 在其对应的通道为阴性, 则整个样本制备实验无效。如果三个基因的 PCR PC 在其对应的通道为阴性 (如 DENV PC 为 HEX 通道阴性), 则整个 PCR 扩增实验无效。样本制备无效和扩增实验无效时均不需要分析数据, 需要找到原因后再进行后续实验, 可能原因包括操作失误、试剂变质或仪器故障。
 - 6.2、NC: 样本制备 NC 和 PCR NC 应该在所有通道呈阴性。如果样本制备 NC 或 PCR NC 结果在任何通道为阳性, 则整个样本制备和 PCR 扩增实验无效, 不需要分析数据, 需要找到原因后再进行后续实验。可能原因是环境污染。
 - 6.3、如果 PC 和 NC 均正常, 则实验有效, 可以对待测样本结果进行分析。
7. 样本结果分析: 如果 FAM 通道、HEX 通道和 Cy5 通道的 Ct 大于或等于 40, 或者没有 Ct 值, 则判为阴性。如果 Ct 小于 40, 并且荧光信号呈现倒 S 的典型扩增曲线, 则判断为该通道对应的基因阳性。FAM 通道阳性则表示含有 ZIKV, HEX 通道阳性则表示含有 DENV, Cy5 通道阳性则表示含有 CHIKV。