|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:15-42420****低温运输，-20℃保存** | tiandz logo |
| **蓝氏贾第鞭毛虫探针法荧光定量PCR试剂盒*****Giardia lamblia* Probe PCR Kit** |
| **使用手册V1.0** |
| **北京天恩泽基因科技有限公司****北京市海淀区上地信息路26号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦506****网址：[www.tiandz.com](http://www.tiandz.com)；电话：400-6765278；电邮：order@tiandz.com** |
| **产品及特点** | 蓝氏贾第鞭毛虫（*Giardia lamblia*）主要寄生人体小肠、胆囊主要在[十二指肠](https://baike.baidu.com/item/%E5%8D%81%E4%BA%8C%E6%8C%87%E8%82%A0/727923%22%20%5Ct%20%22_blank)，可引起腹痛、腹泻和吸收不良等症状，导致[贾第虫病](https://baike.baidu.com/item/%E8%B4%BE%E7%AC%AC%E8%99%AB%E7%97%85/8469958%22%20%5Ct%20%22_blank)，为人体肠道感染的常见[寄生虫](https://baike.baidu.com/item/%E5%AF%84%E7%94%9F%E8%99%AB/3819%22%20%5Ct%20%22_blank)之一。蓝氏贾第鞭毛虫分布于世界各地。由于旅游事业的发展，在旅游者中发病率较高，故又称旅游者腹泻，已引起各国的重视。蓝氏贾第鞭毛虫感染的患者，以无症状带虫者居多，潜伏期多在两周左右，甚至可达数月不等，临床症状视病变部位而异，其表面多种多样，症状轻重也有不同，因此快速检测具有重要意义。荧光定量PCR是检测传染性疾病的主流技术，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蓝氏贾第鞭毛虫的试剂盒，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，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，引物是根据人蓝氏贾第鞭毛虫高度保守区设计，不会跟其他微生物的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. 本产品既可用于定性，也可用于定量。
7. 本产品只能用于科研。
 |
| **规格及成分** |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 成分 | 编号 | 十孔盒包装 |
| 2×Probe qPCR MagicMix | 190303 | 0.5 mL（本色盖） |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 180701 | 1 mL（黄盖） |
| 蓝氏贾第鞭毛虫探针法qPCR引物混合液 | 15-42420yw | 100 μL（白盖） |
| 蓝氏贾第鞭毛虫qPCR探针0.5μM | 15-42420pro | 50 μL（棕色管） |
| 蓝氏贾第鞭毛虫探针法qPCR阳性对照(1×10E8拷贝/μL) | 15-42420pc | 50 μL（黄盖） |
| 天净沙核酸释放剂试用装 | 61202 | 20次（1mL，绿色） |
| 使用手册 | 15-42420sc | 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/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7，6，5，4，3，2。
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7号管中加入5 μL 1×10E8拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得1×10E7拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在6号管中加入5 μL 1×10E7拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，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。
5. 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。
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**1. 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10μL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。
2. 用自选方法纯化样品的DNA，本试剂盒跟市场上大多数鞭毛虫DNA提取试剂盒兼容。本试剂盒免费赠送20次免DNA提取的天净沙核酸释放剂，本产品的裂解液可以直接作为PCR模板，省略了DNA提取步骤。其使用手册可从本公司网站[www.tiandz.com通过搜索产品名称天净沙核酸释放剂或产品编号61202](http://www.tiandz.com通过搜索产品名称天净沙核酸释放剂或产品编号61202)下载。

**三、Probe qPCR反应（20μL体系，在样品制备室进行）**1. 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，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号阳性对照稀释液，浓度为10000拷贝/μL）。下面只描述定量分析的步骤，定性分析只是把6个标曲反应缩减成1个，其余不变。
2. 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）：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **成分** | **样品管****N+2个** | **PCR阴性对照管** | **标准曲线****样品管（2-7管）** |
| 2×Probe qPCR MagicMix | 10 μL | 10 μL | 各10 μL |
| 蓝氏贾第鞭毛虫探针法qPCR探针 | 2 μL | 2 μL | 各2 μL |
| 蓝氏贾第鞭毛虫探针法qPCR引物混合液 | 2 μL | 2 μL | 各2 μL |
|  待测样品DNA模板 | 6 μL | 不加 | 不加 |
| 第7步所得标准曲线样品稀释液（2-7号） | 不加 | 不加 | 各6μL（2号样到2号管，3号样到3号管…） |

1. 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℃ | 10 min |
| PCR反应（40个循环） | 95℃ | 15 sec |
| 60℃ | 60 sec（采集FAM通道的荧光信号） |

**五、数据处理**1. 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。
2. 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。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** | 蓝氏贾第鞭毛虫可视化LAMP检测试剂盒 |

20190628dx