

天
净
沙
系
列

CAT#:14-21200
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

弓形虫荧光定量 PCR 检测试剂盒(染料法)
Toxoplasma gondii qPCR Kit (Dye based)

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; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点	弓形虫 (<i>Toxoplasma gondii</i>) 是一种可感染包括人在内所有温血动物的细胞内寄生原虫，对人畜的危害很大，孕妇感染弓形虫后导致早产、流产、胎儿发育畸形，是当今致畸胎的四大原因之一，也是免疫功能低下患者死亡的主要原因 (如 AIDS 病人等)。 传统的显微镜病原体检查方法，检出率低；以抗体检测为主的血清学诊断方法不能准确反映弓形虫现时感染情况。PCR 检测技术的发展为解决这些问题提供了更灵敏的方法。 本产品就是以 PCR 技术为基础开发的专门检测弓形虫的试剂盒，它具有下列特点： 1. 即开即用，用户只需要提供样品模板，操作简单，定量准确快速。 2. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。 3. 特异性高。根据弓形虫高度保守的 529 bp 重复序列设计专一性引物，与其他病原体无交叉反应。 4. 灵敏度比常规 PCR 高 2-3 个数量级，可以达到几十拷贝/反应。 5. 一管式荧光定量 PCR 检测，避免后续污染。 6. 本试剂盒足够 100 次 20μL 反应体系的荧光定量 PCR。 7. 本产品只适用于科研，不能用于临床诊断。			
规格及成分		成分	编号	十孔盒包装 (去纸托)
		2 $\times$ qPCR MagicMix	90408	0.5 mL (装 A 袋)
		超纯水	100935	1 mL (装 A 袋)
		弓形虫 PCR 引物 F	11-1260f	0.5 OD (装 B 袋)
		弓形虫 PCR 引物 R	11-1260r	0.5 OD (装 B 袋)
		弓形虫基因阳性对照 (1 $\times$ 10E8 copy/ μ L)	11-1260pc	50 μ L (装 C 袋)
		使用手册	11-3390sc	1 份
运输及保存	低温运输、-20 $^{\circ}$ C 保存(A 袋试剂放样品准备区、C 袋的阳性对照最好分开放置)，有效期一年。			
自备试剂	DNA 模板、10 $\times$ ROX (根据机型决定，具体见使用方法)。			
使用方法	一、样品 DNA 的制备 1. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数原虫 DNA 提取试剂盒兼容。本公司的柱式粪便 DNA 提取试剂盒也可以用于弓形虫 DNA 提取。 二、引物的制备 (在样品制备室进行) 2. 按引物标签提示在装引物干粉的管中直接加入适量的超纯水 (加入量见引物试管上的标签)，使得两条引物的浓度均为 10μM (10pmol/μL)，然后各取 110μL 混合在一起得 220μL，标注为引物混合物，放冰上待用。220μL 足够 100 次 qPCR			

反应。

三、稀释阳性对照（以 10E2-10E7 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，只提供可以直接使用的长为 92 bp 的 DNA 片段作为阳性对照。

3. 标记 6 个离心管，分别为 7，6，5，4，3，2。
4. 用带芯枪头分别加入 45 μL 超纯水（最好用带芯枪头，下同）。
5. 在 7 号管中加入 5 μL 1×10^8 拷贝/ μL 的阳性对照，充分震荡 1 分钟，得 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
6. 换枪头，在 6 号管中加入 5 μL 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
7. 换枪头，从 6 号管中取 5 μL 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照到 5 号管中，充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
8. 换枪头，从 5 号管中取 5 μL 1×10^5 拷贝/ μL 的阳性对照到 4 号管中，得 1×10^4 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
9. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。

三、设置 qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

10. 在 PCR 管中加入下列成分（待测样品需要做三次重复，下表只列出一次。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	阴性对照	阳性对照(2-7 管)
2 $\times$ qPCR MagicMix	10 μL	10 μL	各 10 μL
引物混合物	2 μL	2 μL	各 2 μL
自备 10 $\times$ ROX (见注)	2 μL	2 μL	各 2 μL
待测样品 DNA 模板	1-5 μL	不加	不加
阳性对照（2-7 号）	不加	不加	各 5 μL （2 号样到 2 号管,3 号样到 3 号管…）
补水到	20 μL	20 μL	20 μL

注:仅 ABI7500、7700 和 7900 仪器需要使用 ROX 作为对照，其他荧光 PCR 仪器（如 iCycler IQ、MJ Option、MJ Chromo4、MX3000、MX4000、RotorGene 3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480）不需要使用 ROX。

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR（具体 PCR 参数可以根据仪器不同而自行

	优化)。													
	<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>3 分钟</td></tr><tr><td rowspan="3">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>94℃</td><td>50 秒</td></tr><tr><td>58℃</td><td>60 秒</td></tr><tr><td>72℃</td><td>60 秒</td></tr></table>	过程	温度	时间	预变性	95℃	3 分钟	PCR 反应 (45 个循环)	94℃	50 秒	58℃	60 秒	72℃	60 秒
	过程	温度	时间											
	预变性	95℃	3 分钟											
	PCR 反应 (45 个循环)	94℃	50 秒											
58℃		60 秒												
72℃		60 秒												
12. 数据采集														
具体操作按所用仪器推荐的流程进行。一般在复性步骤采集荧光数据。本产品中所含的荧光染料在不结合 DNA 时，最大吸收光谱在 471 nm，结合 DNA 时的最大吸收光谱在 500 nm，最大发射光谱在 530 nm。														
四、数据处理														
13. 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。														
关联产品	PCR 抑制物清除剂(CAT#:60804)，即用型荧光定量 PCR 试剂盒 (CAT#:90408-1)													