天净沙系列

CAT#:15-38320-5

低温运输，-20℃保存

天净沙

粪便寄生虫 5 重探针法 PCR 试剂盒

Fecal Parasites Quintuple Probe PCR Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是粪便寄生虫 5 重探针法 PCR 试剂盒，本试剂盒主要检测以下五种寄生虫:带绦虫(*Taenia* spp.)、艾美耳球虫(*Eimeria* spp.)、肝片吸虫(*Fasciola hepatica*，*F.hepatica*)、蛔虫(*Ascaris* spp.)、管圆线虫(*Angiostrongylus cantonensis*，*A.cantonensis*)。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，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据五类粪便寄生虫 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
5. 可以用于分型，两管式扩增，一次能区分五类粪便寄生虫。
6. 用于定量检测和分型，不建议用于定量。分型后可以再另购定量试剂盒。
7. 本产品足够 100 次 20μL 体系的两管式 5 重探针法 qPCR 反应，足够检测 50 个样本（算上对照，每个样本测两次）。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用十一孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL×2	0.5 mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
三重粪便寄生虫探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉（*Taenia* spp.、*Eimeria* spp.、*F.hepatica*）	yp15-38320-5a	50 次	0.5 mL 棕塑盖
双重粪便寄生虫探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉（*A.cantonensis*、*Ascaris* spp.）	yp15-38320-5b	50 次	0.5 mL 棕塑盖
Taenia spp.探针法 qPCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc58800	250 μL	0.5 mL 黄盖管
Eimeria spp.探针法 qPCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc49900	250 μL	0.5 mL 黄盖管
F.hepatica 探针法 qPCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc38320	250 μL	0.5 mL 黄盖管
A.cantonensis 探针法 qPCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc40710	250 μL	0.5 mL 黄盖管
Ascaris spp.探针法 qPCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc64000	250 μL	0.5 mL 黄盖管
超纯水	210806	250 μL	1.5 mL 蓝盖管

	使用手册	15-38320-5sc	1 份	无

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 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 试剂盒提供的阳性对照再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为样本制备的 PC。另外用水作为样本制备的 NC。
2. 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核酸纯化试剂盒。

二、设置三重 Probe qPCR 反应（20 μL 体系）

3. 首次使用本产品时，需要在本试剂盒提供的两管引物探针干粉管中，各加入 165 μL 自备的超纯水，涡旋震荡 30 秒混匀后放冰上待用。没有用完的部分需要放-20℃。
4. 如果每个样本只做 1 次重复，则需要 N+2 个管用于 N+2 个样本，另外 1 个管用于 PCR 阴性对照（用水做模板），最后 1-5 个管用于 PCR 阳性对照（试剂盒提供 5 种粪便寄生虫的阳性对照，用户可以任意选择 1-5 种）。分别在各管加入：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	1-5 PCR 阳性对照管
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL
三重粪便寄生虫探针法 qPCR 引物-探针混合液（*Taenia* spp.、*Eimeria* spp.、*F.hepatica*)	各 3 μL	3μL	3 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加
自备超纯水	不加	7 μL	不加
粪便寄生虫探针法 qPCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL) (从提供的 5 种中任选 1-5 种)	不加	不加	7 μL

三、设置双重 Probe qPCR 反应（20 μL 体系）

5. 如果每个样本只做 1 次重复，则需要 N+2 个管用于 N+2 个样本，另外 1 个管用于 PCR 阴性对照（用水做模板），最后 1-5 个管用于 PCR 阳性对照（试剂盒提供 5 种粪便寄生虫的阳性对照，用户可以任意选择 1-5 种）。分别在各管加入：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	1-5 PCR 阳性对照管
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL
双重粪便寄生虫探针法 qPCR 引物-探针混合液 (*Ascaris* spp.、*A.cantonensis*)	各 3 μL	3 μL	3 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加
自备超纯水	不加	7 μL	不加
粪便寄生虫探针法 qPCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL) (从提供的 5 种中任选 1-5 种)	不加	不加	7 μL

四、Probe qPCR 反应（20 μL 体系）

6. 将三重 PCR 和双重 PCR 反应管盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR:

过程	温度	时间
预变性	95℃	10 min
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	10 sec
	60℃	60 sec（采集 FAM、HEX、Texas Red 三个通道的荧光信号，设置 TAMRA 为淬灭基团）

四、数据处理

7. 阴性对照 Ct 必须没有数值，等于或者大于 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 40。如果不符合上述要求，则整个实验无效，需要重做或者跟厂家联系。
8. 如果对照合格，则实验有效，可以分析待测样本。
9. 对待测样本，如果其所对应的荧光信号的 Ct 小于 40 则为阳性。如果没有 Ct 值，或大于或等于 40 则为阴性。
10. 对阳性的样本，按其阳性的荧光信号确定其分型:

PCR	荧光信号	所属分型
三重 PCR	FAM	*Taenia* spp.
	HEX	*Eimeria* spp.
	Texas Red	*F.hepatica*
双重 PCR	FAM	*Ascaris* spp.
	HEX	*A.cantonensis*

关联产品	艾美耳球虫属通用探针法 qPCR 试剂盒（不含内参）