天净沙系列

CAT#:15-18600

低温运输，-20℃保存

利什曼原虫通用探针法 qPCR 试剂盒（不含内参）

Leishmania spp. Probe qPCR Kit

使用手册 V1.0

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

利什曼原虫（*Leishmania* spp）泛指利什曼虫属的锥体虫科原虫，是一种会引起利什曼病的寄生虫。利什曼原虫的主要宿主为脊椎动物，常见的感染对象包括蹄兔目、啮齿目、犬科、和人类。目前全世界有 88 个国家报告过利什曼原虫症的病例，感染人数达 1,200 万人。对人和哺乳动物致病的利什曼原虫有：引起人体内脏利什曼病的为杜氏利什曼原虫（*Leishmania donovani*），引起皮肤利什曼病的为热带利什曼原虫（*L. tropica*）和墨西哥利什曼原虫（*L. mexicana*），引起粘膜皮肤利什曼病的为巴西利什曼原虫（*L. araziliensis*）等。我国的黑热病是由杜氏利什曼原虫引起的。因此快速检测利什曼原虫具有重要意义。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利什曼原虫通用的试剂盒，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，分析灵敏度高，可以达到 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性结果。
4. 本产品至少可以检测 *L. major*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* 这五种利什曼原虫。
5. 特异性高，引物是根据利什曼原虫 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。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 qPCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	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
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
利什曼原虫通用 qPCR 引物-探针干粉	yp15-18600eb	50 次	0.5 mL 棕色管
利什曼原虫通用 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	pc18610-GQ246767-act	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	15-18600sc	1 份	无

注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165 μL 的超纯水充分混匀后得到引物-探针混合液再使用，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，超纯水，核酸纯化试剂盒。
使用方法	**一、稀释标准曲线样品**（以 1E1-1E6 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 1E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 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 1E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E5 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 1E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E4 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 上步所得第 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次样本制备所要求的起始样本体积一样，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 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	标准曲线样品管 (1-6 管)

2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
利什曼原虫通用 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 qPCR:

过程	温度	时间
预变性	95℃	4 min.
PCR 反应（36 个循环）	95℃	15 sec.
	57℃	15 sec.
	72℃	45 sec（采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA）

注：部分机型如果三步法效果不理想可采用两步法： 95℃ 10 分钟，（95℃ 15 秒、60℃ 30 秒）循环 36 次，每个循环第二步采集荧光信号。

四、数据处理

12. 如果样本制备阳性对照或 PCR 阳性对照(包括标曲样本)结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据，需要重新样本制备，重新进行 PCR 扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或 PCR 阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系。
13. 如果阴性对照和阳性对照均正常，则实验有效，可以进入后续分析。
14. 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。
15. 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 必须没有读数，或者大于或等于 36。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 36。对待测样品，如果其 Ct 没有读数、大于或等于 36 则均为阴性，如果小于 36 则为阳性。

关联产品	利什曼原虫通用可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒