天净沙系列

CAT#:17-51620v2

常温运输及保存

天净沙

牡蛎包拉米虫探针法 qPCR 试剂盒 v2.0

Bonamia ostreae Probe qPCR Kit v2.0

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

牡蛎包拉米虫（*Bonamia ostreae*）是一种寄生性原生动物，主要侵染太平洋牡蛎、欧洲牡蛎等多种经济双壳贝类，通过破坏贝类血细胞引发包拉米虫病，对稚贝、幼贝及成贝均具有高致病性，可导致贝类大规模死亡，严重冲击全球贝类养殖产业的健康发展，对水产养殖业造成重大经济损失。目前尚无有效治疗方法，因此快速检测牡蛎包拉米虫 DNA 具有重要的意义。本产品就是在牡蛎包拉米虫 DNA 探针法 PCR 产品基础上升级的干粉型试剂盒，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. 干粉型，可常温运输低温保存，而且最高样本加入量提高到 16 μL，降低了漏检率。
3. 引物和探针经过优化升级，分析灵敏度高，可以达到 100 拷贝/反应。
4. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
5. 含识别内源性内参的引物和探针，便于排除 PCR 假阴性结果。
6. 特异性高，引物是根据牡蛎包拉米虫 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
7. 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。
8. 本产品足够 48 次 20 μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
9. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用带 logo 热封袋包装

成分	编号	规格	包装
PCR MasterMix 冻干微球	250804	8 次×6	密封八联排管
荧光 PCR 模板专用稀释液干粉	180701v2	48 T	1.5 mL 绿盖管
牡蛎包拉米虫 qPCR 引物-探针干粉（含内参引物探针）	yp17-51620v2	48 T	0.5 mL 棕色管
牡蛎包拉米虫 qPCR 阳性对照干粉（1E7 拷贝/μL）	pc51620-AF262995-18S	48 T	0.5 mL 黄盖管
使用手册	sc17-51620v2	1 份	1 份

运输及保存

常温运输及保存，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 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。

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，使用已知是阳性的样本），一个是 NC（样品制备阴性对照，，使用已知是阳性的样本）。可以用用水作为 NC。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的免提核酸释放剂。

三、Probe qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

9. 首次使用本试剂盒时，将装有荧光 PCR 模板专用稀释液干粉、引物-探针干粉和阳性对照干粉的离心管短暂离心，然后分别加入 1 mL、165 μL 和 50 μL 的超纯水充分混匀后分别得到荧光 PCR 模板专用稀释液、引物-探针溶液和阳性对照溶液，以上溶液均放冰上待用。上述溶液在未用完时需放-20℃保存。
10. 如果是定量检测并且每个反应只做 1 次重复，则标记 N+9 个装有 PCR MasterMix 冻干微球的 PCR 管（试剂盒提供），其中 N+2 个用于第 7 步得到的 N+2 个 DNA 样品，1 个用于扩增阴性对照，6 个用于标准曲线样品。如果是定量检测并且每个反应只做 1 次重复，则标注出 N+4 个管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个 DNA 样品，1 个用于扩增阴性对照，1 个用于扩增阳性对照。下表以定量检测为例：

成分	样品管 (N+2 个)	扩增阴性 对照管	标曲样品管 (1-6 管)
PCR MasterMix 冻干微球	1 颗	1 颗	1 颗
引物-探针混合液（第 9 步）	各 4 μL	4 μL	各 4 μL
N+2 个 DNA 样品（第 7 步）	16 μL	不加	不加
超纯水	不加	16 μL	不加
6 个标准曲线样（第 6 步）	不加	不加	各 16 μL（2 号样到 2 号管，3 号样到 3 号管…）

注：如果减少样本的用量，必须加入等量的超纯水使加入成份的总体积为 20 μL。

11. 加入后轻柔吹打数次混匀，短暂离心 10 秒，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℃	3 min
PCR 反应 （45 个循环）	95℃	15 sec
	46℃	30 sec
	72℃	30 sec（采集 FAM 和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团分别为 TAMRA 和 BHQ3）

四、数据处理

12. 本试剂盒阴性阳性判断 Ct 阈值为 40。如果一个反应 FAM 或 Cy5 通道无 Ct 或 Ct 大于或等于阈值，则判为该通道阴性。如果一个反应 FAM 或 Cy5 通道 Ct 小于阈值，并且有标准的倒 S 型扩增曲线，则判为该通道阳性。
13. 如果样本制备阳性对照或扩增阳性对照结果为阴性（对定性实验，1E4 拷贝/μL 的样本为阳性对照。对定量实验，浓度从 E2 到 E6 拷贝/μL 的 5 个标曲样本可以当作阳性对照样本，其中任何一个为阴性都算扩增阳性对照为阴性），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扩增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。
14. 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。
15. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以 6 个标曲样本浓度的 log 值为横轴，以各自的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线并得到回归方程。再以每个待测样品的 Ct 值用回归方程计算出其 DNA 浓度的 log 值，再从 log 值计算出其在反应管中的浓度（拷贝/反应），再根据此浓度推算加入反应管前 DNA 样本的浓度（拷贝/μL），再结合核酸纯化时起始材料用量和最后得到的 DNA 体积计算出纯化前的样本的起始浓度（对实体组织单位为拷贝/mg，对液体材料单位是拷贝/mL）。
16. 如果把本试剂盒用于定性检测，则样本纯化阳性对照和扩增阳性对照都必须阳性。同时，样本纯化阴性对照和扩增阴性对照也必须是阴性，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，判断标准见第 12 步。如果样本为 FAM 阳性，不管 Cy5 通道为阳性还是阴性，均判样本为阳性。如果样本为 FAM 阴性，Cy5 通道为阳性，则判样本为阴性；如果样本为 FAM 阴性，Cy5 通道为阴性，则判结果为无效。此无效样本需要重复测试。

关联产品	牡蛎包拉米虫可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒