

**公司产品仅科研研究使用，不得用于临床诊断！**

**【预期用途】**

**五倍子染料法PCR鉴定试剂盒**本产品就是以染料法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测的试剂盒。

**【检验原理】**

本试剂盒即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板，引物经过优化，灵敏度高，分析灵敏度可以达到 100 拷贝/反应，提供阳性对照，便于区分假阴性样品，特异性高，引物是根据指标高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应，本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的染料法荧光定量 PCR 反应，既可用于定性，也可用于定量。用于定量时线性范围至少5个数量级。

**【试剂组成】**

产品名称	规格
2 $\times$ SYBR qPCR MasterMix	0.5mL $\times$ 1管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL $\times$ 1 管
超纯水	1mL $\times$ 1 管
染料法qPCR 引物混合液	100 $\mu$ L $\times$ 1 管
qPCR 阳性对照(1 $\times$ 10E7 拷贝/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L $\times$ 1 管

说明：不同批号的试剂盒组分不可交互使用。

**【运输及保存】**

低温运输，-20 $^{\circ}$ C 保存，保存期限为 12 个月。

**【自备试剂】**

样品 DNA。

**【适用仪器】**

ABI、安捷伦MX3000P/3005P、LightCycler、Bio-Rad、eppendorf等系列荧光定量PCR检测仪。

**【使用方法】**

**五倍子染料法PCR鉴定试剂盒**试剂准备（试剂准备区）

稀释标准曲线样品（以 10E1-10E6 拷贝/ $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 1 $\times$ 10E7 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1 $\times$ 10E6 拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。

4. 换枪头，在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  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。

#### 样本处理（样本处理区）

2.1 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 10  $\mu\text{L}$  第 6 步所得的第 4 号稀释液（ $1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ）再加上一定量的水使总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样本体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。

2.2 核酸提取：核酸提取可以采用公司的核酸提取或纯化试剂，操作方法按照说明书进行。

#### 3. 染料法 qPCR 反应（20 $\mu\text{L}$ 体系，在样品制备室进行）

3.1 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（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（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。

**五倍子染料法 PCR 鉴定试剂盒** 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一重复。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	PCR 阴性	标准曲线
2 $\times$ SYBR qPCR	N+2 个	对照管	样品管（1-6 管）
MasterMix	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	各 10 $\mu\text{L}$
染料法 qPCR 引物混合液	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	各 2 $\mu\text{L}$
N+2 个待测 DNA 模板	8 $\mu\text{L}$	-	-
超纯水	-	8 $\mu\text{L}$	-

**第 6 步所得标准曲线样品稀释液（1-6 号）各 8  $\mu\text{L}$ （2 号样到 2 号管，3 号样到 3 号管...）**

盖上盖子上机，按下面参数进行 PCR：

过程	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	5 分
PCR 反应（35 个循环）	95 $^{\circ}\text{C}$	10 秒
60 $^{\circ}\text{C}$	40 秒（采集 SYBR 通道的荧光信号）	
溶解曲线分析		按 qPCR 仪器手册执行

注意：循环次数不要超过 35 个循环。

#### 【结果判定】

通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有 Ct 值，但 Tm 值跟阳性对照 Tm 不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，数据无效，不予以分析。Tm 跟阳性对照 Tm 一致的，为有效 Ct。

如果两种阴性对照的溶解曲线所得 Tm 值跟阳性对照的 Tm 值一样，说明环境或试剂可能有过去的 PCR 扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。

如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 PCR 阴性对照）是假阳性，可以继续分析其它样品有效数据。

对定量检测，以阳性对照样品的浓度的 log 值为横轴，以有效 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再换算出待测样品的 DNA 浓度。

对定性检测，则有有效 Ct 值的为阳性，无有效 Ct 值的为阴性。

**【注意事项】**

1. PCR 操作各阶段应严格分区操作，避免交叉污染。
2. 各组分不得与其他产品或不同批号的相应成分进行互换。
3. 待测标本若不及时检测，应保存于-20℃或-70℃。
4. 样品的处理应该严格按照生物安全规范操作。
5. PCR 操作人员应具有经验和受过专业培训。
6. 本试剂盒仅用于科研使用，不做为临床诊断使用。