



# 马泰勒梨形虫(原 *Babesia equi*)探针法荧光定量 PCR 试剂盒

## 产品及特点:

马匹的梨形虫病是一种由蜱传播的感染性、非接触性血液原虫寄生虫病，致病原为马泰勒虫（原马巴贝斯虫 *Babesia equi*）。可感染马、驴、骡及斑马，侵犯宿主红细胞，引起不同程度的溶血性贫血。若马匹感染泰勒虫后未采取相应的治疗措施，感染马匹将呈终生持续感染状态。马匹感染梨形虫若呈慢性感染经过，则很少表现出临床症状，这也是梨形虫病容易被忽视的重要原因。马梨形虫病在全球范围内流行，尤以适宜虫媒蜱生存的热带和亚热带地区为主。由梨形虫的流行感染所引起的马匹流产死亡、高额的治疗费用以及对疫区马匹国际运输及参赛的限制，都对马业造成了极大的经济损失。因此快速灵敏检测马泰勒梨形虫具有重要意义。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马泰勒梨形虫的试剂盒。

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，灵敏性高。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据马泰勒梨形虫(原 *Babesia equi*)高度保守区设计，不会跟其他病毒 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
6. 本产品只能用于科研。



## 规格及成分:

编号	成分	规格
试剂一	2×Probe qPCR MagicMix	500μL(本色盖)
试剂二	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL(黄盖)
试剂三	马泰勒梨形虫(原 Babesia equi)qPCR 引物混合液	100μL(白盖)
试剂四	马泰勒梨形虫(原 Babesia equi)qPCR 探针	50μL(棕色管)
试剂五	马泰勒梨形虫(原 Babesia equi)探针法 qPCR 阳性对照( $1 \times 10^8/\mu\text{L}$ )	50μL(红盖)
使用手册		1 份

## 运输及保存:

低温运输,  $-20^{\circ}\text{C}$ 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 $10^2$ - $10^7$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ 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 7, 6, 5, 4, 3, 2。
2. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu\text{L}$  荧光 PCR 专用模板稀释液, 最好用带芯枪头, 下同)。
3. 在 7 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 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。



6. 放冰上待用。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 $\mu$ L 阳性对照的 10000 倍稀释液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 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。

## 三、Probe qPCR 反应（20 $\mu$ L 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（用第 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）：

成份	N+2 个样品管	PCR 阴性对照管	标准曲线样品管 (2-7 管)
2 $\times$ Probe qPCR MagicMix	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	各 10 $\mu$ L
马泰勒梨形虫(原 Babesia equi)qPCR 探针	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	各 1 $\mu$ L
马泰勒梨形虫(原 Babesia equi)探针 qPCR 引物混合液	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	各 2 $\mu$ L
N+2 个待测 DNA 模板	7 $\mu$ L	--	--
超纯水	--	7 $\mu$ L	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液(2-7 号)	--	--	各 7 $\mu$ L (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 PCR：

过程	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}$ C	3 min
PCR 反应 40 个循环	95 $^{\circ}$ C	15 sec
	60 $^{\circ}$ C	1 min (采集 FAM 通道的荧光信号)



#### 四、数据处理：

12. 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 RNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。

13. 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 必须大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于或等于 30。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性，如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。若重复结果 Ct 值小于 40，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

**上海纪宁实业有限公司([www.shjning.com](http://www.shjning.com))所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。**