BaEV 基因拷贝数检测试剂盒（qPCR- 荧光探针法）说明书

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

Cat. No. HG-BA001

产品简介

Bluekit®系列BaEV 基因拷贝数检测试剂盒是用于定量检测 BaEV 基因拷贝数的专用试剂盒。

本试剂盒基于荧光探针法，定量检测样本中 BaEV 基因的拷贝数。本试剂盒检测快速，专一性强，性能可靠。

配套我司血液 / 组织 / 细胞基因组 DNA 提取试剂盒（货号为 HG-NA100）进行样品的前处理。

检测范围：2×10^{1} copies/μL~2×10^{6} copies/μL

规格

100 Reactions

产品组成

表 1 试剂盒组分

组 分	规格	存储条件
BaEV 定量参考品（$2x10^{8}$ copies/μL ）	50μL×1 管	-20°C
BaEV Primer&Probe Mix	550μL×1 管	
2× qPCR Reaction Buffer	1.2mL×1 管	
DNA 稀释液	1.5mL×3 管	
ROX High	50μL×1 管	
ROX Low	50μL×1 管	

储存条件与有效期

存储条件见上表，有效期 18个月。

适用机型

包括但不限于 ABI7500、BioRad CFX96、博日 FQD-96A、Roche Light Cycler 480 等实时定量荧光 PCR 仪器。

表 2 不同仪器适配的参比染料 ROX

仪器	ROX 参比染料
Applied Biosystems® 5700，7000，7300，7700，7900HT，StepOne™，and StepOnePlusT™	ROX High
Applied Biosystems® 7500，ViiATM 7，QuantStudio™12K Flex，Agilent Mx3000P™，Mx3005P™，and Mx4000™	ROX Low
Rotor-Gene™，DNA Engine Opticon™，Opticon™2，Chromo 4™ Real-Time Detector，Mastercycler® ep realplex，Smart Cycler®，Roche LightCycle®480，Roche LightCycler®Nano，Bio-Rad CFX96，and IIIumina Eco™	No ROX

备注：请对应机型选择适配的 ROX。如上表中未查询到对应机型可咨我司或仪器厂家。

需要准备的耗材与设备

实验前请准备好下列耗材与设备：

- 1.5mL 或 2mL 无菌低吸附离心管
- 与 PCR 仪适配的 96 孔 qPCR 板或八联排管
- 1000μL，200μL，10μL 无菌低吸附带滤芯枪头
- 荧光定量 PCR 仪
- 水浴锅 / 金属浴
- 离心机
- 震荡器
- 各规格移液器（如 1000μL，200μL，10μL，2.5μL 等）
- 磁力架

实验步骤

一、 样品前处理

详见我司血液 / 组织 / 细胞基因组 DNA 提取试剂盒（货号为 HG-NA100）操作说明书。

二、 qPCR 操作步骤

1. 定量参考品及 NTC/NCS 的制备

1.1 定量参考品：取出 BaEV 定量参考品、DNA 稀释液置于冰上融化；待完全融化后，轻微振荡混匀，瞬时离心；

1.2 取 7 支干净的 1.5mL 离心管，分别标记为 ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5，ST6；

1.3 标准品稀释过程如下表

表 3. 标准品稀释过程

标准品代号	稀释体积	浓度（copies/μL）
ST0	10μL BaEV参考品 +90μL DNA 稀释液	2×10^7
ST1	10μL ST0 + 90μL DNA 稀释液	2×10^6
ST2	10μL ST1 + 90μL DNA 稀释液	2×10^5
ST3	10μL ST2 + 90μL DNA 稀释液	2×10^4
ST4	10μL ST3 + 90μL DNA 稀释液	2×10^3
ST5	10μL ST4 + 90μL DNA 稀释液	2×10^2
ST6	10μL ST5 + 90μL DNA 稀释液	2×10^1

1.4 NTC 的制备：100uL DNA 稀释液；

1.5 NCS 的制备：随样品取 100μL DNA 稀释液进行样品预处理。

2. q-PCR 反应液的制备和加样

2.1 根据所需检测的标准样品和待测样品数量（一般做 3 个复孔），计算所需孔数：

反应孔数 =（6 个浓度梯度的标曲 +2 个阴性对照 NTC 和 NCS + 待测样品）×3

2.2 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR Mix 总量：

qPCR Mix =（反应孔数 +2 或 3）× 15μL（2 或 3 为操作损失量）

2.3 将所需试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 4 所示配制 qPCR Mix。

表 4.　qPCR Mix 配制表

组分	单个反应量 (μL)
2×qPCR Reaction Buffer	10
BaEV Primer&Probe Mix	4.6
ROX*	0.4
总体积	15

备注：请对应机型选择适配的 ROX；若机型适配为 no ROX，请加入等体积的去离子水（要求无核酸及核酸酶污染）。

3. 将所需试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 5 所示加样（总体积 20μL）

表 5. 各反应孔加样示例

参考品	15μL qPCR Mix +5μL ST1/2/3/4/5/6
阴性对照	15μL qPCR Mix +5μL NTC/NCS
待测样品	15μL qPCR Mix +5μL 待测样本

4. 实验需使用 qPCR 实验专用的八联管或者 96 孔板进行反应，需去除反应体系中的气泡，并离心将液体离至管底准备反应。

5. 反应孔排版示例

表 6.　96 孔板排版示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST1	ST1	ST1							S1	S1	S1
B	ST2	ST2	ST2							S2	S2	S2
C	ST3	ST3	ST3							S3	S3	S3
D	ST4	ST4	ST4									
E	ST5	ST5	ST5									
F	ST6	ST6	ST6									
G					NTC	NTC	NTC					
H					NCS	NCS	NCS					

三、 qPCR 反应程序和参数设置

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例。

1. 创建实验反应程序，设置两步法反应程序如下表

表 7.　PCR 反应程序

Stage1	预变性	Reps:1	95°C	2min
Stage2	循环反应	Reps:40	95°C	15s
			60°C	30s

备注：反应体积 20μL。程序中 60°C 30s 处设置为荧光收集。其他型号的设备，如遇问题可咨我司或仪器厂家。

2. 创建实验反应板，点击 Select Fluorophores 选择荧光 FAM；在反应板图表中，选择样品孔，在 Sample Type 中下拉选择 Unknow，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 BaEV；输入每个样品的重复次数及 Sample Name；

3. 在反应板图表中，选择标曲孔，在 Sample Type 中下拉选择 Standard，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 BaEV；输入每个稀释梯度的重复次数及 Sample Name。分别在 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6 的 Concentration 一栏赋值为 2.00E+06、2.00E+05、2.00E+04、2.00E+03、2.00E+02、2.00E+01（单位为 copies/μL）；

4. 点击 Run 界面“Start Run”按钮进行 PCR 测定。

四、 qPCR 结果分析

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例

1. 点击资料分析视窗 Quantitation，可读取标准曲线的斜率（Slope）、截距（Intercept）、扩增效率（Effect）、R^2。

2. 在视窗 Quantitation Data 中，SQ Mean 一栏可读取无模板对照 NTC、NCS、待测样本的检测值，单位为 copies/μL。

3. 数据可靠性评估：

- 三个平行孔间 Ct 值差应小于 1.0，Ct 值大于 35 的孔除外；
- 阴性对照 NTC 和 NCS 的 CT 值都应大于标曲最低浓度的 CT 值或根据实验室自身验证结果设定标准；
- 标准曲线线性相关系数 $R^2 \geqslant 0.98$，扩增效率 85%~110% 之间；

4. BaEV 阴性判定标准 : 样本 3 个平行孔无 Ct 值或有 2 个孔无 Ct 值和 1 个孔有 Ct 值且检出孔的 Ct 值大于 LLOQ 的 Ct值。

5. BaEV 阳性判断标准 : 样本 2 个或以上孔检出 BaEV 基因拷贝数不低于 10copies/uL，判定为 BaEV 基因阳性。

注意事项

1. 本试剂盒已通过稳定性（冻融等因素）的验证，无需分装。

2. 阴性样品和阳性样品（参考品和待测样品等）的配制环境需区分区域，不可在一个区域内操作，配制人员需穿戴整齐，戴好口罩、手套和穿好洁净服。

3. 注意在不同加样步骤间及时更换吸头，避免交叉污染，避免长时开盖。

4. 试剂盒必须在有效期内使用。

5. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用。

6. 只有严格遵守说明书的操作方法，全部使用本试剂盒配套的试剂才能保证最佳检测效果。

7. 尽量在当天完成样本前处理纯化后立即进行后续 qPCR 检测，以保证检测结果的准确性。

8. 最终的试验结果与试剂的有效性、操作者的操作方法及试验环境密切相关。

9. 公司只对试剂盒本身负责，不对因使用该试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本的可能使用量，预留充足的样本。

10. 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

免责声明

在所有情况下， 本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

©2024 谱新生物 Hillgene. All right reserved. Ver.3.2412
江苏谱新生物医药有限公司
A. 苏州市吴中区吴中大道 1463 号越旺智慧谷 4 号楼
T.400 900 1882 W.www.hillgene.com