

Code No. RR260A

研究用

---

**Takara**

*Kudoa septempunctata*

(18S rRNA) qPCR Detection Kit

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒外所需器材	1
● 使用相关	1
● 操作注意事项	1
● 操作流程	2
● 补充：关于区域划分	3
● 关联产品	3

## ● 制品说明

本制品是使用了记载于日本厚生劳动省通知（食安监发 0427 第 3 号）[关于 *Kudoa septempunctata* 检查法]的引物、探针序列，利用 Real Time PCR 法检测 *Kudoa septempunctata* 的试剂盒。试剂盒中除 Real Time PCR 用试剂外，还附带定量用阳性对照质粒（Kudoa Positive Control）。

## ● 制品内容 (20 μl 反应×50 次量)

1. Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus) (2× conc.)	500 μl
2. Kudoa Primer/Probe Mix (10× conc.)* <sup>1</sup>	100 μl
3. dH <sub>2</sub> O	1 ml
4. ROX Reference Dye (50× conc.)	20 μl
5. ROX Reference Dye II (50× conc.)	20 μl
6. Kudoa Positive Control (2.5×10 <sup>7</sup> copies/μl)* <sup>2</sup>	50 μl
7. EASY Dilution (for Real Time PCR)	1 ml×2

\*1: 荧光标记探针（FAM-TAMRA 标记）应避光保存。

\*2: 若混入其他试剂（1-5）中，会影响 PCR 反应的准确性。因此，要防止污染其他组份。

## ● 保存: -20℃

Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus)融化后 4℃保存，避免反复冻融。

4℃保存 6 个月性能稳定。长期保存时，在最初融化时分装后-20℃保存。

## ● 试剂盒外所需器材

- Real Time PCR 仪及专用反应管  
Thermal Cycler Dice™ Real Time system // (Code No. TP900/TP960)  
Thermal Cycler Dice Real Time system Lite (Code No. TP700/TP760)  
Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific), etc.
- 桌面离心机
- 200 μl, 20 μl 和 10 μl 移液枪
- 移液枪配套枪头（带有疏水滤膜）

## ● 使用相关

- 由于本试剂盒是基因检测试剂盒，也可用于失活的 *Kudoa septempunctata* 的检出。另外，设计的 Probe/Primer 的序列内发生基因变异、缺失/插入时，可能会出现无法检出的情况。（关于检测结果判定时产生的相关问题，Takara Bio 不承担任何责任。）
- 检测样品判定为阳性时，请用微生物学方法进一步确认。

## ● 操作注意事项

1. Real Time PCR 仪的使用请按照各自的说明书进行操作。
2. 如果探针、引物因混入核酸酶而被降解，则不能准确进行检测。实验者的汗液和唾液也会带入核酸酶，操作时应注意。
3. PCR 反应是灵敏度非常高的反应。为防止污染，建议从反应液的配制到检测样品的添加，设定以下 3 个实验区域，并进行物理性隔离。无论是哪一个区域，对于含有扩增产物的反应管请尽量避免开盖。  
区域 1: 反应液的配制及分装。  
区域 2: 检测样品的制备。  
区域 3: 向反应液中加入检测样品。

由于本制品使用 Real Time PCR 法，扩增反应与检测同时进行，反应后的扩增产物不需要再进行电泳。为了避免实验室内核酸的污染，严禁从 Tube 管中取出扩增产物。

4. 使用本制品获得的结果是以 Real Time PCR 仪的分析为基础来判定的。如果 Real Time PCR 仪的任一 Auto 功能出现问题都可能导致错误的判定结果，因此要依据仪器说明书来正确设置 Real Time PCR 仪。

## ● 操作流程

※ DNA提取等前处理请按照厚生劳动省通知（食安监发0427第3号）[关于*Kudoa septempunctata*检查法]进行操作。

1. 阳性对照（制作标准曲线用标准品）的制备（在区域3进行）

使用EASY Dilution (for Real Time PCR) 梯度稀释Kudoa Positive Control

$2.5 \times 10^7$  (原液)  $\rightarrow 2.5 \times 10^5 \rightarrow 2.5 \times 10^3 \rightarrow 2.5 \times 10^1$  copies/ $\mu$ l

（每个反应体系添加4  $\mu$ l阳性对照梯度样品，阳性对照在反应体系中的最终拷贝数分别为 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^2$ ）。

2. 按下列组份在冰上配制PCR反应液（在区域1进行）。

将下列组份除模板外配成所需管数+ $\alpha$ 的混合液后，向每个0.2 ml microtube中添加16  $\mu$ l混合液，轻轻盖上盖子。其中一个microtube作为阴性对照加4  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O后，盖紧盖子。

【使用Thermal Cycler Dice Real Time System series时】(1个反应)

试剂	使用量
<i>Premix Ex Taq</i> (Tli RNaseH Plus)	10 $\mu$ l
Kudoa Primer/Probe Mix	2 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	4 $\mu$ l
检测样品或阳性对照或灭菌水	(4 $\mu$ l) <sup>*1</sup>
Total	20 $\mu$ l

【使用Applied Biosystems 的Real Time PCR仪时】(1个反应)

试剂	使用量
<i>Premix Ex Taq</i> (Tli RNaseH Plus)	10 $\mu$ l
Kudoa Primer/Probe Mix	2 $\mu$ l
ROX Reference Dye or Dye II <sup>*2</sup>	(0.4 $\mu$ l)
dH <sub>2</sub> O	3.6 $\mu$ l
检测样品或阳性对照或灭菌水	(4 $\mu$ l) <sup>*1</sup>
Total	20 $\mu$ l

\*1: 在区域1不添加检测样品和阳性对照。

\*2: StepOnePlus使用ROX Reference Dye, 7500 Fast Real-Time PCR System使用ROX Reference Dye II。

[注意] 不要直接用手触摸microtube表面，以免影响荧光信号的收集。

3. 模板的添加（在区域3进行）。

向除阴性对照以外的tube管中分别加入4  $\mu$ l检测样品和阳性对照，盖紧盖子。用桌面离心机进行轻微离心，放置于Real Time PCR仪上。

[注意] 不要直接用手触摸microtube表面，以免影响荧光信号的收集。

4. 开始Real Time PCR反应

按照下面的反应条件进行Real Time PCR反应。

Real Time PCR仪的详细操作方法请参照其说明书。

预变性 (Hold)

Cycle: 1  
95°C 30 sec

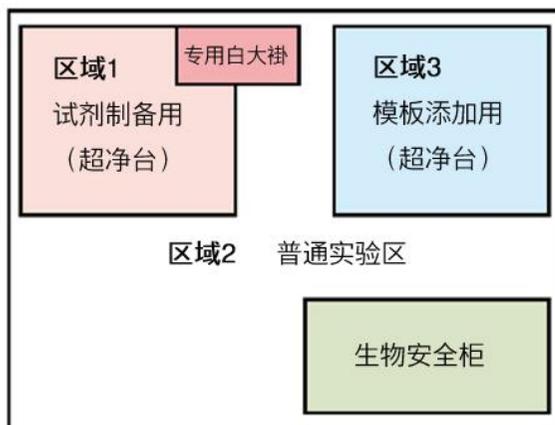
#### 2 Step PCR

Cycle: 45  
95°C 5 sec  
60°C 30 sec (检测FAM)

5.反应结束后进行结果分析。

※ 结果分析请参照厚生劳动省通知内容[关于*Kudoa septempunctata*检查法] (食安监发0427第3号)。

### ● 补充: 关于区域划分



- 区域1: 只处理反应试剂的区域进行Real-time PCR反应液的制备, 分装等。(不允许带入任何模板DNA)
- 区域2: 普通实验区样品的处理及DNA的制备。根据需要设置生物安全柜。
- 区域3: 处理高浓度DNA的区域分装后的反应液中添加模板DNA。标准品的稀释也在该区域进行。

### ● 关联产品

Thermal Cycler Dice™ Real Time System // (Code No. TP900/TP960)  
Thermal Cycler Dice™ Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760)  
Probe qPCR Mix (Code No. RR391A/B)  
EASY Dilution (for Real Time PCR) (Code No. 9160)  
NucleoSpin Tissue (Code No. 740952.10/.50/.250)

Thermal Cycler Dice and *Premix Ex Taq* are trademarks of TAKARA BIO INC.

**注意**

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站[www.takara-bio.com](http://www.takara-bio.com)。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 TAKARA BIO INC.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686  
4006518761, 4006518769

**TAKARA BIO INC.**

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>