

CAT#:15-11300

低温运输，-20℃保存

BINGENE

衣原体通用探针法 qPCR 试剂盒

Chlamydia spp. Probe PCR Kit

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	衣原体（<i>Chlamydia spp.</i>）是一种比细菌小但比病毒大的生物，是专性细胞内寄生的、近似细菌与病毒的病原体，具有两相生活环。它没有合成高能化合物 ATP、GTP 的能力，必须由宿主细胞提供，因而成为能量寄生物，多呈球状、堆状，有细胞壁，有细胞膜，属原核细胞，一般寄生在动物细胞内。其中的肺炎衣原体被认为是肺炎、支气管炎及其他呼吸道感染的常见病因；鹦鹉热衣原体可引起鹦鹉热，是人类吸入受感染的鸟的排泄物的干燥尘粒而感染，发病时常有高烧、头痛、肌肉痛、寒战和上下呼吸道不适，部分患者可并发脑炎、心肌炎或血栓性静脉炎。沙眼衣原体除可导致沙眼外，还是公认的性传播疾病的传染源之一。在非淋菌性尿道炎中，几乎一半是由沙眼衣原体传染造成的。它还可以引起尿道综合征和性病性淋巴肉芽肿、男性尿道炎、附睾炎、女性不育、子宫颈炎、盆腔炎等。新生儿通过产道感染可引起新生儿眼炎或新生儿肺炎。因此快速检测衣原体具有重要意义。荧光定量 PCR 是检测传染性疾病的主流技术，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衣原体的试剂盒，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. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/反应。 3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。 4. 特异性高，引物是根据衣原体 DNA 的高度保守区设计，<i>in silico</i> 分析发现其不会跟其他非衣原体的 DNA 发生交叉反应。 5. 可以检测至少 6 种常见的支原体：<i>Chlamydia abortus</i>，<i>Chlamydia pecorum</i>，<i>Chlamydia pneumonia</i>，<i>Chlamydia psittaci</i>，<i>Chlamydia suis</i>，<i>Chlamydia trachomatis</i>。 6. 本产品既可以定量，也可以定性。定量时其线性范围至少有 5 个数量级。 7. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。 8. 本产品只能用于科研。			
规格及成分	本产品采用五孔盒包装			
	成分	编号	规格	包装材料
	2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5mL 本色盖
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5mL 绿盖管
	超纯水	210806	1 mL	1.5mL 蓝盖管
	衣原体通用探针法 qPCR 引物-探针混合液	yp15-11300	150 μL	0.5mL 棕色管
	衣原体通用 PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pc11300-D89067.1	50 μL	0.5mL 黄盖管

	使用手册	15-11300sc	1 份	无
运输及保存	低温运输，-20℃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 10E1-10E6 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）。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 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 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 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 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 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 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E4 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），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10μL 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟核酸制备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。 8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本扩增试剂盒跟市场上大多数细菌 DNA 提取试剂盒兼容。也可以使用本公司的核酸提取试剂盒。 三、Probe qPCR 反应（20μL 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（可直接用第 6 步所得的第 4 号稀释液）。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）：	<table><tr><th>成分</th><th>样品管 N+2 个</th><th>PCR 阴性 对照管</th><th>标准曲线样品管 (1-6 管)</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>10 μL</td><td>10 μL</td><td>各 10 μL</td></tr><tr><td>衣原体通用探针法 qPCR 引物-探针混合液</td><td>3 μL</td><td>3 μL</td><td>各 3 μL</td></tr><tr><td>N+2 个待测 DNA 模板</td><td>7 μL</td><td>不加</td><td>不加</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>不加</td><td>7 μL</td><td>不加</td></tr><tr><td>第 6 步所得标准曲线样品稀 释液（1-6 号）</td><td>不加</td><td>不加</td><td>各 7μL（1 号样到 1 号管,2 号样到 2 号 管…）</td></tr></table>	成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性 对照管	标准曲线样品管 (1-6 管)	2×Probe qPCR MasterMix	10 μL	10 μL	各 10 μL	衣原体通用探针法 qPCR 引物-探针混合液	3 μL	3 μL	各 3 μL	N+2 个待测 DNA 模板	7 μL	不加	不加	超纯水	不加	7 μL	不加	第 6 步所得标准曲线样品稀 释液（1-6 号）	不加	不加	各 7μL（1 号样到 1 号管,2 号样到 2 号 管…）
	成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性 对照管	标准曲线样品管 (1-6 管)																						
	2×Probe qPCR MasterMix	10 μL	10 μL	各 10 μL																						
	衣原体通用探针法 qPCR 引物-探针混合液	3 μL	3 μL	各 3 μL																						
	N+2 个待测 DNA 模板	7 μL	不加	不加																						
	超纯水	不加	7 μL	不加																						
	第 6 步所得标准曲线样品稀 释液（1-6 号）	不加	不加	各 7μL（1 号样到 1 号管,2 号样到 2 号 管…）																						
	11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：	<table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>3 min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>95℃</td><td>15sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60sec（采集 FAM 通道的荧光 信号，设置 3`TAMRA 为淬灭 基团）</td></tr></table>	过程	温度	时间	预变性	95℃	3 min	PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15sec	60℃	60sec（采集 FAM 通道的荧光 信号，设置 3`TAMRA 为淬灭 基团）													
	过程	温度	时间																							
	预变性	95℃	3 min																							
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15sec																								
	60℃	60sec（采集 FAM 通道的荧光 信号，设置 3`TAMRA 为淬灭 基团）																								
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 DNA 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，则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 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 40，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 40，则为阴性。如果 Ct 小于 40 则为阳性。																										
关联产品	衣原体属通用可视化 LAMP 检测试剂盒																									