|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:15-11730** **低温运输，-20℃保存** |  |
| **流感嗜血杆菌探针法荧光定量 PCR 试剂盒 *Haemophilus influenzae Probe* qPCR 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**](http://www.bingene.com)**；电话：400-6605850；电邮：order@bingene.com** |
| **产品及特点** | 流感嗜血杆菌是一种没有运动力的革兰氏阴性杆菌。流感嗜血杆菌最初被误 认为是流行性感冒的病因，在发现流行性感冒的病毒性病原后，才消除了这种误 解。不过，流感嗜血杆菌仍会导致其他不同种类的病症。因此快速检测流感嗜血 杆菌具有重要意义。本公司开发了简单快捷的流感嗜血杆菌探针法荧光定量 PCR 检测试剂盒，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/μL。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据流感嗜血杆菌DNA高度保守区设计，不会跟其他的DNA发生交叉反应。
5. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为5个数量级。
6. 本产品足够50次20μL体系的探针法荧光定量PCR反应。
7. 本产品只能用于科研。
 |
| **规格及成分** |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 成分 | 编号 | 五孔盒包装 |
| 2×Probe qPCR MagicMix | 190303 | 500μL本色盖） |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 180701 | 1mL（红盖） |
| 超纯水 | 100935 | 1mL（紫盖） |
| 流感嗜血杆菌qPCR引物-探针混合液 | yp15-11730  | 150μL（棕色管） |
| 流感嗜血杆菌阳性对照(1×10E7拷贝/μL) | pc11730  | 50μL（黄盖） |
| 使用手册 | 15-11730 sc | 1份 |

 |
| **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45μL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5μL 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5μL 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5μL 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**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10μL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。
2. 用自选方法纯化样品的DNA，本试剂盒跟市场上大多数细菌DNA提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的细菌DNAout或柱式细菌DNAout。

**三、Probe qPCR反应（20μL体系，在样品制备室进行）**1. 如果只做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，6个用于标准曲线样品。
2. 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）：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **成分** | **样品管****N+2个** | **PCR阴性对照管** | **标准曲线****样品管（2-7管）** |
| 2×Probe qPCR MagicMix | 10μL | 10μL | 各10μL |
| 流感嗜血杆菌 PCR引物-探针混合液 | 3μL | 3μL | 各3μL |
|  待测样品DNA模板 | 7μL | 不加 | 不加 |
| 第7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…） |

1. 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℃ | 5min |
| PCR反应（45个循环） | 95℃ | 15S |
| 60℃ | 1 min（采集FAM通道的荧光信号） |

**五、数据处理**1. 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。
2. 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 35。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35则为阴性，如果小于或等于30则为阳性。如果在30-35之间，则重复一次。若重复结果Ct值小于30，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。
 |
| **关联产品** | 流感嗜血杆菌探针法荧光定量PCR试剂盒 |