

天
净
沙
系
列

CAT#:15-18515
低温运输, -20℃保存

BINGENE

斑点热群立克次体探针法 qPCR 试剂盒

Spotted Fever Group Rickettsia 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; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

<p>产品及特点</p>	<p>立克次体 (Rickettsias) 是一大类专性真核细胞内寄生的原核微生物，常呈多形性，革兰氏阴性。多种立克次体是重要的人兽共患病原体，可通过媒介昆虫的叮咬和排泄物、或气溶胶进行传播，广泛分布于世界各地。常见的立克次体疾病主要有斑疹伤寒、斑点热、恙虫病、Q 热，其对应的病原体分别为斑疹伤寒群立克次体 (Typhus Group Rickettsiae, TGR)、斑点热群立克次体 (Spotted Fever Group Rickettsiae, SFGR)、恙虫病东方体 (<i>Orientia tsutsugamushi</i>, Ot) 和贝氏柯克斯体 (<i>Coxiella burnetii</i>, Cb)。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上述四种之一的斑点热群立克次体的通用的试剂盒，它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 1000 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，引物是根据斑点热群立克次体 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。 5. <i>In silico</i> 分析发现本产品可以检测 <i>R.rickettsii</i>、<i>R.heilongjiangensis</i>、<i>R.sibirica</i>、<i>R.raoultii</i>、<i>R.conori</i> 和 <i>R.montana</i> 这些属于 SFGR 的立克次氏体。 6. 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。 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。 																							
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>五孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2\timesProbe qPCR MagicMix</td> <td>190303</td> <td>0.5 mL (本色管)</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>180701</td> <td>1 mL (绿盖管)</td> </tr> <tr> <td>超纯水(PCR 级)</td> <td>210806-1</td> <td>1 mL (蓝盖管)</td> </tr> <tr> <td>斑点热群立克次体 qPCR 引物-探针混合液</td> <td>yp15-18515</td> <td>150 μL (棕色管)</td> </tr> <tr> <td>斑点热群立克次体 qPCR 阳性对照(1\times10E7 拷贝/μL)</td> <td>pc18515-MG811713.1</td> <td>50 μL (黄盖管)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>15-18515sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	五孔盒包装	2 \times Probe qPCR MagicMix	190303	0.5 mL (本色管)	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (绿盖管)	超纯水(PCR 级)	210806-1	1 mL (蓝盖管)	斑点热群立克次体 qPCR 引物-探针混合液	yp15-18515	150 μ L (棕色管)	斑点热群立克次体 qPCR 阳性对照(1 \times 10E7 拷贝/ μ L)	pc18515-MG811713.1	50 μ L (黄盖管)	使用手册	15-18515sc	1 份
成分	编号	五孔盒包装																						
2 \times Probe qPCR MagicMix	190303	0.5 mL (本色管)																						
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (绿盖管)																						
超纯水(PCR 级)	210806-1	1 mL (蓝盖管)																						
斑点热群立克次体 qPCR 引物-探针混合液	yp15-18515	150 μ L (棕色管)																						
斑点热群立克次体 qPCR 阳性对照(1 \times 10E7 拷贝/ μ L)	pc18515-MG811713.1	50 μ L (黄盖管)																						
使用手册	15-18515sc	1 份																						
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20$^{\circ}$C 保存，保存期限为 12 个月。</p>																							
<p>自备试剂</p>	<p>样品 DNA。</p>																							

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 $45\ \mu\text{L}$ 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 $5\ \mu\text{L}\ 1\times 10E7$ 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 $1\times 10E6$ 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 $5\ \mu\text{L}\ 1\times 10E6$ 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 $1\times 10E5$ 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 $5\ \mu\text{L}\ 1\times 10E5$ 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 $1\times 10E4$ 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 $10\ \mu\text{L}$ 上步所得 4 号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样品 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qPCR 反应 ($20\ \mu\text{L}$ 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 (直接用第 6 步第 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) :

成分	样品管	PCR 阴性	标准曲线样品管
----	-----	--------	---------

	N+2 个	对照	(1-6 管)
2×Probe qPCR MagicMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
斑点热群立克次体 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 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 (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℃	10 min
PCR 反应 (34 个循环)	95℃	10 sec
	60℃	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 设置 TAMRA 为淬灭基团)

五、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 Ct 必须等于或者大于 33, 或者没有 Ct 值。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 33。对待测样品, 如果其 Ct 小于 33 则为阳性。如果在大于或等于 33 则为阴性。

关联产品

斑点热群立克次体荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒