

天
净
沙
系
列

CAT#:15-29930

低温运输，-20℃保存

BINGENE

幽门螺杆菌探针法 qPCR 试剂盒

Helicobacter pylori 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: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	幽门螺杆菌(<i>Helicobacter pylori</i>, HP) 是一种螺旋形、微厌氧、对生长条件要求十分苛刻的细菌。国内外对它的分子生物学、致病机制、流行病学、相关疾病等方面进行了大量的研究, 现代医学也已经证明, HP 可以导致慢性胃炎、十二指肠肠炎、消化性溃疡、胃癌、粘膜相关性淋巴瘤(MALT)等疾病的发生。WHO 将 HP 作为胃癌的主要致病因子。因此, 快速、准确的检测 HP 的感染对大众健康具有重要意义, 对医生治病也有巨大帮助。因此快速灵敏诊断幽门螺杆菌具有重要意义。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幽门螺杆菌的试剂盒, 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/μL。 3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。 4. 特异性高, 引物和探针是根据幽门螺杆菌 DNA 高度保守区设计, 不会跟其他生物的 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	本产品用五孔盒包装 <table><tr><th>成分</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MagicMix</td><td>190303</td><td>0.5 mL</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</td><td>1.5 mL 绿盖</td></tr><tr><td>超纯水(PCR 级)</td><td>210806-1</td><td>1 mL</td><td>1.5 mL 蓝盖</td></tr><tr><td>幽门螺旋杆菌探针法 qPCR 引物-探针混合液</td><td>15-29930yp</td><td>150 μL</td><td>0.5 mL 棕色管</td></tr><tr><td>幽门螺旋杆菌探针法 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)</td><td>29930pc</td><td>50 μL</td><td>0.5 mL 黄盖</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>15-29930sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>				成分	编号	规格	包装材料	2×Probe qPCR MagicMix	190303	0.5 mL	0.5 mL 本色管	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖	超纯水(PCR 级)	210806-1	1 mL	1.5 mL 蓝盖	幽门螺旋杆菌探针法 qPCR 引物-探针混合液	15-29930yp	150 μL	0.5 mL 棕色管	幽门螺旋杆菌探针法 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	29930pc	50 μL	0.5 mL 黄盖	使用手册	15-29930sc	1 份	无
成分	编号	规格	包装材料																													
2×Probe qPCR MagicMix	190303	0.5 mL	0.5 mL 本色管																													
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖																													
超纯水(PCR 级)	210806-1	1 mL	1.5 mL 蓝盖																													
幽门螺旋杆菌探针法 qPCR 引物-探针混合液	15-29930yp	150 μL	0.5 mL 棕色管																													
幽门螺旋杆菌探针法 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	29930pc	50 μL	0.5 mL 黄盖																													
使用手册	15-29930sc	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（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（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
幽门螺杆菌 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℃	5 min
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	10 sec
	60℃	45 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 TAMRA)

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。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 35 则为阴性，如果小于 35，则为阳性。

关联产品

幽门螺杆菌荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒