

福氏志贺氏菌探针法qPCR试剂盒（不含内参） Shigella flexneri Probe PCR Kit

货号: BN64794

低温运输, -20℃保存

产品及特点

志贺氏菌 (*Shigella*) 又称为痢疾杆菌, 属于革兰氏阴性兼性细胞内致病菌, 临床上可引起细菌性痢疾。志贺氏菌属共有四个种 48 个血清型, 包括痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*)、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*)、宋内氏志贺氏菌 (*Shigella sonnei*) 和鲍氏志贺氏菌 (*Shigella boydii*)。福氏志贺氏菌又名弗氏志贺氏菌, 该细菌常引起痢疾的暴发和流行, 给全球人类健康带来极大的威胁。因此福氏志贺氏菌的快速检测具有重要意义。为此本公司以探针法 qPCR 技术为基础开发了福氏志贺氏菌的检测试剂盒, 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, 灵敏度高, 最低检测限可达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, 引物是根据福氏志贺氏菌基因组DNA高度保守区设计, 不会跟其它生物的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5个数量级。
6. 本产品足够50次20 μL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

本产品使用五孔盒包装

| 成分 | 编号 | 规格 | 包装 |
|---------------------------|---------|--------|--------|
| 2×Probe qPCR MasterMix | 60001 | 500 μL | 0.5 mL |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 60002 | 1 mL | 1.5 mL |
| 超纯水 | 60003 | 1 mL | 1.5mL |
| 福氏志贺氏菌 qPCR 引物-探针干粉 | 64794-4 | 50 次 | 0.5 mL |
| 福氏志贺氏菌阳性对照 (1E7 拷贝/μL) | 64794-5 | 50 μL | 0.5 mL |
| 使用手册 | | 1 份 | 无 |

本产品仅用于科研

| | |
|---------------------|--|
| | <p>注意：引物-探针干粉在使用前需要离心，然后在离心管中加入165 μL的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20°C保存。</p> |
| <p>运输及保存</p> | <p>低温运输，-20°C保存，保存期限为24个月。</p> |
| <p>自备物品</p> | <p>超纯水，样品DNA。</p> |
| <p>使用方法</p> | <p>一、稀释标准曲线样品（以$1\text{E}1$-$1\text{E}6$拷贝/μL这6个10倍稀释度为例）。</p> <p>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。本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供DNA片段作为阳性对照。</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 $1\text{E}7$拷贝/μL的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡混匀1分钟，得到$1\text{E}6$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 $1\text{E}6$拷贝/μL的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡混匀1分钟，得到$1\text{E}5$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 $1\text{E}5$拷贝/μL的阳性对照(上步所得)，充分震荡混匀1分钟，得到$1\text{E}4$拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。 6. 依次重复上面的操作得到6个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。 <p>二、样品DNA的制备</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 μL上步所得4号稀释液再加上一一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。 <p>三、qPCR 反应（20 μL体系，在样品制备室进行）</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 N+3个 | PCR阴性 对照管 | 标曲样品管 (1-6) |
|---------------------------|-------------|--------------|---------------------------------|
| 2×Probe qPCR MasterMix | 各10 μL | 10 μL | 各10 μL |
| 福氏志贺氏菌 qPCR 引物-探针混合液 | 各3 μL | 3 μL | 各3 μL |
| 待测样本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7 μL（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：

| 过程 | 温度 | 时间 |
|------------------|-----|------------------------------|
| 预变性 | 95℃ | 5 min |
| PCR反应 (45个循环) | 95℃ | 15 sec |
| | 60℃ | 1min (采集FAM通道，淬灭基团为TAMRA) |

四、数据处理

12. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系，购买新的引物和探针。
13. 如果阴性对照和阳性对照正常，则实验有效，可以进入后续分析。
14. 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。

15. 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，若无Ct或Ct大于或等于40，则为阴性。如果Ct小于40则为阳性。