



# 莫氏立克次体(现名伤寒立克次体)探针法荧光定量 PCR 试剂盒

## 产品及特点:

地方性斑疹伤寒亦称蚤型或鼠型斑疹伤寒,由莫氏立克次体以鼠蚤为媒介而引起的急性传染病。莫氏立克次体接种雄性豚鼠腹腔后,豚鼠除发热外,阴囊高度水肿,称之为豚鼠阴囊现象。莫氏立克次体在睾丸鞘膜的浆细胞中繁殖甚多,其鞘膜渗出液涂片可查见大量立克次体。莫氏立克次体可引起大白鼠发热或致死,并在其脑内存活数月,故可用之保存菌种或传代;接种于小白鼠腹腔内可引起致死性腹膜炎及败血症。因此对莫氏立克次体进行快速灵敏的诊断具有重要的意义。本公司开发了简单快捷的莫氏立克次体探针法荧光定量 PCR 检测试剂盒。

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,灵敏性高。
3. 提供阳性对照,便于区分假阴性样品。
4. 特异性高,引物是根据莫氏立克次体(现名伤寒立克次体)高度保守区设计,不会跟其他病毒 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
6. 本产品只能用于科研。

## 规格及成分:

| 编号  | 成分  | 规格               |
|-----|---|------------------|
| 试剂一 | 2 $\times$ Probe qPCR MagicMix              | 500 $\mu$ L(本色盖) |
| 试剂二 | 荧光 PCR 专用模板稀释液                              | 1mL(黄盖)          |
| 试剂三 | 莫氏立克次体(现名伤寒立克次体) qPCR 引物混合液                 | 100 $\mu$ L(白盖)  |
| 试剂四 | 莫氏立克次体(现名伤寒立克次体) qPCR 探针                    | 50 $\mu$ L(棕色管)  |
| 试剂五 | 莫氏立克次体(现名伤寒立克次体) 探针法 qPCR 阳性对照(1 $\times$ ) | 50 $\mu$ L(红盖)   |



|  |               |     |
|--|---------------|-----|
|  | 10E8/ $\mu$ L |     |
|  | 使用手册          | 1 份 |

## 运输及保存:

低温运输,  $-20^{\circ}\text{C}$  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 $10\text{E}2$ - $10\text{E}7$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ 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 7, 6, 5, 4, 3, 2。
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 7 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。
6. 放冰上待用。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 $\mu$ L 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。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容。

### 三、Probe qPCR 反应 (20 $\mu$ 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（用第 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）：

| 成份                             | N+2 个<br>样品管 | PCR 阴<br>性对照管 | 标准曲线样品管<br>(2-7 管)                      |
|--------------------------------|--------------|---------------|---|
| 2 $\times$ Probe qPCR MagicMix | 10 $\mu$ L   | 10 $\mu$ L    | 各 10 $\mu$ L                            |
| 莫氏立克次体（现名伤寒立克次体）qPCR 探针        | 1 $\mu$ L    | 1 $\mu$ L     | 各 1 $\mu$ L                             |
| 莫氏立克次体（现名伤寒立克次体）探针法 qPCR 引物混合液 | 2 $\mu$ L    | 2 $\mu$ L     | 各 2 $\mu$ L                             |
| N+2 个待测 DNA 模板                 | 7 $\mu$ L    | --            | --                                      |
| 超纯水                            | --           | 7 $\mu$ L     | --                                      |
| 第 7 步所得标准曲线样品稀释液(2-7 号)        | --           | --            | 各 7 $\mu$ L (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 $^{\circ}$ C | 3 min                 |
| PCR 反应 40 个循环 | 95 $^{\circ}$ C | 15 sec                |
|               | 60 $^{\circ}$ C | 1 min(采集 FAM 通道的荧光信号) |

### 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 RNA 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 40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于或等于 30。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性，如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。若重复结果 Ct 值小于 40，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

**上海纪宁实业有限公司([www.shjning.com](http://www.shjning.com))所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。**