

## 宋内氏志贺氏菌探针法qPCR试剂盒（不含内参） Shigella sonnei Probe qPCR Kit

货号: BN64796

低温运输, -20℃保存

### 产品及特点

宋内志贺菌 (*Shigella sonnei*) 是志贺菌四个群之一, 抗原单一, 只有一个血清型, 是唯一具有鸟氨酸脱羧酶的志贺菌。宋内志贺菌有 I 相和 II 相两个交叉变异相。I 相呈 S 菌落, 对小鼠有致病力, 多自急性期感染病人标本中分离得。II 相为 R 型菌落, 对小鼠不致病, 常从慢性患者或带菌者检出。在我国, 宋内志贺菌是引起细菌性痢疾的主要致病菌。因此快速检测宋内氏志贺氏菌具有重要意义。为此本公司以探针法 qPCR 技术为基础开发了宋内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, 引物是根据宋内氏志贺氏菌基因组DNA高度保守区设计, 可以检测本属的主要物种, 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
宋内氏志贺氏菌 qPCR 引物-探针干粉	64796-4	50 次	0.5 mL
宋内氏志贺氏菌阳性对照 (1E7 拷贝/μL)	64796-5	50 μL	0.5 mL
使用手册		1 份	无

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℃保存。

本产品仅用于科研

<b>运输及保存</b>	低温运输, -20℃保存, 保存期限为24个月。
<b>自备物品</b>	超纯水, 样品DNA。
<b>使用方法</b>	<p><b>一、稀释标准曲线样品 (以1E1-1E6拷贝/μL这6个10倍稀释度为例)。</b></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"> <li>1. 标记6个离心管, 分别为6, 5, 4, 3, 2, 1。</li> <li>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)。</li> <li>3. 在6号管中加入5 μL 1E7拷贝/μL的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡混匀1分钟, 得到1E6拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>4. 换枪头, 在5号管中加入5 μL 1E6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1E5拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>5. 换枪头, 在4号管中加入5 μL 1E5拷贝/μL的阳性对照(上步所得), 充分震荡混匀1分钟, 得到1E4拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。</li> <li>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。</li> </ol> <p><b>二、样品DNA的制备</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>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。</li> </ol> <p><b>三、qPCR 反应 (20 μL体系, 在样品制备室进行)</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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</li> </ol>

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
宋内氏志贺氏菌 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。