

嗜吞噬细胞无浆体探针法 qPCR 试剂盒（不含内参）

Anaplasma phagocytophilum Probe qPCR Kit

CAT#:BN61119

低温运输，-20℃保存

产品及特点	嗜吞噬细胞无浆体 (<i>Anaplasma phagocytophilum</i>) 是一种由两层膜包裹的小型革兰氏阴性多形性球菌，直径一般约为 0.2~2.0 μm，可大至 2 μm，寄生在真核宿主的细胞质内。嗜吞噬细胞无浆体属于人兽共患病病原，该病原能引起宿主食欲不振、发热、远端肢体水肿、抑郁、不愿移动和瘀点出血等常见的临床症状，亦可引起反刍动物产奶量减少。对于健康状况不佳及免疫抑制者，该病原往往导致严重的并发症甚至死亡，对人和动物均有较强致病性，被认为是一种具有重要公共卫生学意义的新兴病原体。因此嗜吞噬细胞无浆体的快速检测具有重要意义，为此本公司以探针法 qPCR 技术为基础开发了嗜吞噬细胞无浆体的检测试剂盒，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，引物是根据嗜吞噬细胞无浆体基因组 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	<table><tr><td></td><td>成分</td><td>编号</td><td>规格</td></tr><tr><td></td><td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>60001</td><td>500 μL</td></tr><tr><td></td><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>60002</td><td>1 mL</td></tr><tr><td></td><td>超纯水</td><td>60003</td><td>1 mL</td></tr><tr><td></td><td>嗜吞噬细胞无浆体 qPCR 引物-探针干粉</td><td>61119-4</td><td>50 次</td></tr><tr><td></td><td>嗜吞噬细胞无浆体阳性对照 (1E7 拷贝/μL)</td><td>61119-5</td><td>50 μL</td></tr></table> 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。					成分	编号	规格		2×Probe qPCR MasterMix	60001	500 μL		荧光 PCR 专用模板稀释液	60002	1 mL		超纯水	60003	1 mL		嗜吞噬细胞无浆体 qPCR 引物-探针干粉	61119-4	50 次		嗜吞噬细胞无浆体阳性对照 (1E7 拷贝/μL)	61119-5	50 μL
	成分	编号	规格																									
	2×Probe qPCR MasterMix	60001	500 μL																									
	荧光 PCR 专用模板稀释液	60002	1 mL																									
	超纯水	60003	1 mL																									
	嗜吞噬细胞无浆体 qPCR 引物-探针干粉	61119-4	50 次																									
	嗜吞噬细胞无浆体阳性对照 (1E7 拷贝/μL)	61119-5	50 μL																									
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。																											
自备物品	超纯水，样品 DNA。																											

使用方法

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）。

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。

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 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。
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。
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。
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。

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 μL 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、qPCR 反应（20 μL 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 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

嗜吞噬细胞无浆体 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μ L	3 μ L	各 3 μ L
待测样本 DNA 模板	7 μ L	不加	不加
超纯水	不加	7 μ L	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 μ L (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 $^{\circ}$ C	2 min
PCR 反应 (40 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15 sec
	60 $^{\circ}$ C	1min (采集 FAM 通道, 淬灭基团为 TAMRA)

注: 伯乐 CFX96 机型建议按下面参数进行 PCR: 95 $^{\circ}$ C 2 分钟, (95 $^{\circ}$ C 15 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒) 循环 40 次, 每个循环第三步采集 FAM 通道的荧光信号。

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