

恙虫病东方体探针法 qPCR 试剂盒（不含内参）

Orientia tsutsugamushi Probe qPCR Kit

CAT#:BN64037

低温运输，-20℃保存

产品及特点	恙虫病东方体（<i>Orientia tsutsugamsushi</i>）属立克次体科东方体属，为革兰阴性专性胞内寄生的杆菌。恙虫病东方体是恙虫病的病原体，该病主要通过恙螨幼虫叮咬而传播，是一种自然疫源性疾病，是由恙虫病东方体引起的一种未分化的急性发热性疾病，是一种复发性感染。对于恙虫病病人来说，它是一种抗生素可治愈的疾病，但是容易误诊，如不加适当的治疗，病死率可达 30%~50%，给人类健康造成极大危害。因此恙虫病东方体的快速检测具有重要意义，为此本公司以探针法 qPCR 技术为基础开发了恙虫病东方体的检测试剂盒，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，引物是根据恙虫病东方体基因组 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	本产品使用五孔盒包装 <table><tr><th>成分</th><th>编号</th><th>规格</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>60001</td><td>500 μL</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>60002</td><td>1 mL</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>60003</td><td>1 mL</td></tr><tr><td>恙虫病东方体 qPCR 引物-探针干粉</td><td>64037-4</td><td>50 次</td></tr><tr><td>恙虫病东方体阳性对照 (1E7 拷贝/μL)</td><td>64037-5</td><td>50 μL</td></tr></table>	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	恙虫病东方体 qPCR 引物-探针干粉	64037-4	50 次	恙虫病东方体阳性对照 (1E7 拷贝/μL)	64037-5	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																	
恙虫病东方体 qPCR 引物-探针干粉	64037-4	50 次																	
恙虫病东方体阳性对照 (1E7 拷贝/μL)	64037-5	50 μL																	

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

	<table><tr><td>使用手册</td><td></td><td>1 份</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。	使用手册		1 份
使用手册		1 份		
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
恙虫病东方体 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℃	30 sec
	55℃	30 sec
	72℃	30 sec (采集 FAM 通道，淬灭基团为 BHQ)

注：部分机型如果三步法效果不理想可采用两步法：95℃ 5 分钟，(95℃ 15 秒、60℃ 60 秒) 循环 45 次，每个循环第二步采集荧光信号。

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。

- | | |
|--|--|
| | <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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 45。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 45, 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 45, 则为阴性。如果 Ct 小于 45 则为阳性。</p> |
|--|--|