

立克次氏体通用探针法qPCR试剂盒（不含内参）

Rickettsia spp. Universal Probe Method qPCR Kit

CAT#:BN64616

低温运输，-20℃保存

产品及特点

立克次氏体 (*Rickettsia* spp.) 是一类严格细胞内寄生的原核细胞型微生物,有3个属,10个种,其中的*Rickettsia prowazekii*(普氏立克次氏体)、*Rickettsia mooseri* (现名*Rickettsia typhi*, 莫氏立克次氏体) 和*Orientia tsutsugamushi* (恙虫病东方体) 等种可导致人类流行性斑疹伤寒、地方性斑疹伤寒、恙虫病、Q热、斑点热等传染病,因此快速检测立克次氏体具有重要意义。本产品就是以探针法荧光定量PCR技术为基础开发的专门检测立克次氏体的试剂盒,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,分析灵敏性高,可以达到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,引物是根据立克次氏体DNA高度保守区设计,不会跟其他细菌的DNA发生交叉反应。
5. 涵盖性广,尤其是能检查危害人类健康的几种立克次氏体。
6. 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为5个数量级。
7. 本产品足够50次20 μL体系的探针法荧光定量PCR反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	编号	规格
2×Probe qPCR MasterMix	60001	0.5 mL
荧光PCR专用模板稀释液	60002	1 mL
超纯水	60003	1 mL
立克次氏体 qPCR引物-探针干粉	64616-4	50次
立克次氏体qPCR阳性对照 (1E7拷贝/μL)	64616-5	50 μL

注意: 引物-探针干粉在使用前需要短暂离心,然后在离心管中加入165μL的超纯水充分混匀后再使用,未用完的需要-20℃保存。

运输及保存

低温运输, -20℃保存, 保存期限为12个月。

自备试剂	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）。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 μL1E7拷贝/μL的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得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 μL1E6拷贝/μL的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得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 μL1E5拷贝/μL的阳性对照(上步所得)，充分震荡1分钟，得1E4拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。 6. 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 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。 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、Probe qPCR 反应（20μL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	RT-PCR 阴性对照	标曲样品管 (1-6)
2×Probe qPCR MagicMix	各10 μL	10 μL	各10 μL
立克次氏体qPCR 引物-探针混合液	各3 μL	3 μL	各3 μL
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7μL (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 (35个循环)	95℃	15 sec
	60℃	40 sec (采集FAM通道的荧光信号，淬灭基团为TAMRA)

12. 注：部分（如：伯乐CFX96）机型如果两步法效果不理想可采用三步法：95℃ 5分钟，（95℃ 15秒、58℃ 15秒、72℃ 30秒）循环35-45次，每个循环第三步采集荧光信号。

四、数据处理

13. 如果样本制备阳性对照或PCR阳性对照(包括标曲样本)结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据，需要重新样本制备，重新进行PCR扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或PCR阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系。

14. 如果阴性对照和阳性对照均正常，则实验有效，可以进入后续分析。

15. 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。

16. 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必须没有读数，或者大于或等于35。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35。对待测样品，如果其Ct没有读数、大于或等于35则均为阴性，如果小于35则为阳性。
--	--