

嗜吞噬细胞无浆体探针法 qPCR 试剂盒

Anaplasma phagocytophilum Probe qPCR Kit

目录号: [ml107818](#)

使 用 说 明 书

产品及特点

嗜吞噬细胞无浆体 (Anaplasma phagocytophilum) 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，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

成分	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	500 μL	0.5mL 本色盖
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管
嗜吞噬细胞无浆体 qPCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 棕色管
嗜吞噬细胞无浆体阳性对照(1E7 拷贝/ μL)	50 μL	0.5mL 黄盖管
使用手册	1 份	1 份
本产品采用五孔盒包装		
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，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, 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加) :

成分	样品管 N+3 个	PCR 阴性对照管	标曲样品管 (1-6 管)
----	-----------	-----------	---------------

2×Probe qPCRMasterMix	各 10μL	10μL	各 10μL
嗜吞噬细胞无浆体 qPCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL
待测样本 DNA 模板	各 7μL	不加	不加
超纯水	不加	7μL	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

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℃	2min
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15sec
	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，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。

自备试剂	超纯水，样品 DNA。
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。