

公司产品仅科研研究使用，不得用于临床诊断！

【预期用途】

根据探针法荧光定量 PCR 原理开发，本试剂盒可在一次反应中快速检测鼠疫耶尔森菌(鼠疫杆菌)caf1 和 pla 和 chro392 基因。

【检验原理】

本试剂盒可用于检测样本中是否含有鼠疫耶尔森菌(鼠疫杆菌)caf1 和 pla 和 chro392 基因。鼠疫耶尔森菌(Y.pestis)，俗称鼠疫杆菌，是鼠疫的病原菌。鼠疫是一种人兽共患的自然疫源性烈性传染病，人类鼠疫多为疫鼠的跳蚤叮咬而感染，是我国法定的甲类传染病。

本试剂盒即开即用，用户只需要提供核酸模板，提供病毒的阳性对照，便于区分假阴性样品，反应快速，灵敏度高，对所有单个病原体的高灵敏度和强特异性，可用于高通量检测，本试剂盒足够做 25μL 体系的探针法荧光定量 PCR50 次，只能用于科研。

【试剂组成】

产品名称	规格
2×Multiplex Probecq PCR Mix	650μL×1 管
DEPC-H ₂ O	1mL×1 管
鼠疫耶尔森菌(鼠疫杆菌)caf1 和 pla 和 chro392 基因三重 qPCR 引物-探针混合液	220μL×1 管
鼠疫耶尔森菌(鼠疫杆菌)caf1 和 pla 和 chro392 基因三重 qPCR 阳性对照 (1×10E8 拷贝/μL)	60μL×1 管

说明：不同批号的试剂盒组分不可交互使用。

【运输及保存】

低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。阳性对照需要单独放置，不要污染其他试剂。

【自备试剂】

样品 DNA。

【适用仪器】

ABI、安捷伦MX3000P/3005P、LightCycler、Bio-Rad、eppendorf等系列荧光定量PCR检测仪。

【使用方法】

鼠疫耶尔森菌(鼠疫杆菌)caf1和pla和chro392基因三重探针法荧光定量PCR试剂盒 试剂准备 (试剂准备区)

稀释标准曲线样品 (以 10E1-10E6 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 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供),充分震荡 1 分钟,得 1×10E6 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 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1×10E5 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 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1×10E4 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。

样本处理 (样本处理区)

2.1 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 10μL 第 6 步所得的第 4 号稀释液 (1×10E4 拷贝/μL) 再加上一定量的水使总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样本体积一样,以此作为 PC。另外用水作为 NC。

2.2 核酸提取:核酸提取可以采用公司的核酸提取或纯化试剂,操作方法按照说明书进行。

3. 染料法 qPCR 反应 (20μL 体系,在样品制备室进行)

3.1 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 (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。

鼠疫耶尔森菌(鼠疫杆菌)caf1和pla和chro392基因三重探针法荧光定量PCR试剂盒 在标记管中按下表加入各成分 (本表只列出一重复。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	N 个 待检样品管	qPCR 阴性对照	qPCR 阳性对照
2 × MultiplexProbeqPCRMix	各 12.5μL	12.5μL	12.5μL
鼠疫耶尔森菌(鼠疫杆菌)caf1 和 pla 和 chro392 基因三重 qPCR 引物探针混合液	各 4μL	4μL	4μL
DEPC-H2O	各 6.5μL	6.5μL	6.5μL

四、添加模板(模板添加区)

向 qPCR 管中分别加入 2μL 模板,顺序为阴性对照 (DEPC-H2O)、待测样品模板、鼠疫耶尔森菌(鼠疫杆菌)caf1 和 pla 和 chro392 基因三重 qPCR 阳性对照,离心 30 秒,立即进行扩增反应。

五、扩增反应(扩增及产物分析区):

将 qPCR 管放置在 qPCR 扩增仪器样品槽相应位置,进行扩增,扩增程序如下:

过程	温度	时间

预变性	95°C	3 min
qPCR 反应 (40 个循环)	95°C	15sec
	58°C	15sec
	72°C	20sec
信号通道	同时选择 FAM/ROX/Cy5 通道采集荧光信号	

荧光基团和淬灭基团选择如下表：

Target	荧光基团	淬灭基团
鼠疫耶尔森菌 caf1 基因	FAM	None
鼠疫耶尔森菌 pla 基因	ROX	None
鼠疫耶尔森菌 chro392 基因	Cy5	None

六、结果分析

1. 如果制作标准曲线，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，推算出其浓度。

2. 如果无需制作标准曲线，按照如下标准判定结果：

阳性对照结果：Ct 值 < 30，有明显指数增长，呈典型的 S 型曲线。

阴性对照结果：Ct 值 > 38 或无 Ct 值，无明显指数增长期和平台期。

样本检测结果：Ct 值 < 35，有明显指数增长，表明样本中检测出鼠疫耶尔森菌(鼠疫杆菌)caf1 和 pla 和 chro392 基因三重，结果为阳性；Ct 值 > 38 或无 Ct 值，表明样本中未检测出鼠疫耶尔森菌(鼠疫杆菌)caf1 和 pla 和 chro392 基因三重，结果为阴性；Ct 值在 35-38 范围，应对样本进行复检，如重复实验结果 Ct 值仍在 35-38 范围，有明显指数增长，则判定为阳性，否则为阴性。

【注意事项】

1. PCR 操作各阶段应严格分区操作，避免交叉污染。
2. 各组分不得与其他产品或不同批号的相应成分进行互换。
3. 待测标本若不及时检测，应保存于-20°C或-70°C。
4. 样品的处理应该严格按照生物安全规范操作。
5. PCR 操作人员应具有经验和受过专业培训。

6. 本试剂盒仅用于科研使用，不做为临床诊断使用。