



白喉棒杆菌探针法荧光定量 PCR 试剂盒

产品及特点:

白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)是引起小儿白喉的病原菌,属于棒状杆菌属(*Corynebacterium*)。菌体大小为(0.3~0.8 μ m) × (1~5 μ m),细长稍弯,粗细不一,菌体一端或两端排列呈棒状,排列不规则,常呈L、V、X、T等字形或排成栅栏状。本菌的致病物质主要是白喉毒素,尚可产生一些侵袭性物质,如类似于结核杆菌的索状因子(Cord factor),能破坏细胞的线粒体膜,导致呼吸和氧化磷酸化作用受到抑制。因此快速灵敏检测白喉棒杆菌具有重要意义。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白喉棒杆菌通用型的试剂盒。

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,灵敏性高。
3. 提供阳性对照,便于区分假阴性样品。
4. 特异性高,引物是根据白喉棒杆菌高度保守区设计,不会跟其他病毒DNA发生交叉反应。
5. 本产品足够50次20 μ L体系的探针法荧光定量PCR反应。

规格及成分:

编号	成分	规格
试剂一	2×Probe qPCR MagicMix	500 μ L (本色盖)
试剂三	荧光PCR专用模板稀释液	1mL (黄盖)
试剂二	白喉棒杆菌探针法qPCR引物混合液	100 μ L (白盖)
试剂四	白喉棒杆菌探针法qPCR探针	50 μ L (棕色管)
试剂五	白喉棒杆菌探针法qPCR阳性对照(1×10E8/ μ L)	50 μ L (红盖)
	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。

自备试剂：

样品 DNA。

使用方法：

一、稀释标准曲线样品 (以 10E2-10E7 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 7, 6, 5, 4, 3, 2。
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 7 号管中加入 5 μL 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E7 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，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。
5. 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。
6. 放冰上待用。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 10μL 阳性对照的 10000 倍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 DNA 提取试剂盒兼容。

**三、Probe qPCR 反应 (20 μ L 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 (用第 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) :

成份	N+2 个样品管	PCR 阴性对照管	标准曲线样品管 (2-7 管)
2 \times Probe qPCR MagicMix	10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
白喉棒杆菌探针法 qPCR 探针	1 μ L	1 μ L	各 1 μ L
白喉棒杆菌探针法 qPCR 引物混合液	2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
N+2 个待测 DNA 模板	7 μ L	--	--
超纯水	--	7 μ L	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)	--	--	各 7 μ L (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 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	3 min
PCR 反应 40 个循环	95 $^{\circ}$ C	15 sec
	60 $^{\circ}$ C	1 min (采集 FAM 通道的荧光信号)

四、数据处理:

12. 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 RNA 浓度的 log 值, 再推算出其浓度。

13. 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 值应该小于或等于 30。对待测



样品, 如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性, 如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间, 则重复一次。若重复结果 Ct 值小于 40, 扩增曲线有明显起峰, 该样本判断为阳性, 否则为阴性。

上海纪宁实业有限公司(www.shjning.com)所有产品仅供科研使用, 不得用于其他用途。