天净沙系列

CAT#:15-29420-caf1-pla

低温运输，-20℃保存

天净沙

鼠疫耶尔森菌 *caf1*/*pla* 基因双重探针法 qPCR 试剂盒

Yersinia pestis caf1/*pla* Duplex Probe qPCR Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)是一种革兰氏阴性、兼性厌氧的杆菌，属于肠杆菌科耶尔森菌属。它是鼠疫的病原体，曾在历史上引发多次大规模疫情，鼠疫症通常起病急骤，症状迅速加重，随着病程进展，不仅局部（如淋巴结）受到感染，还可能牵涉全身（败血症）或主要累及肺部（肺鼠疫），该菌有多个重要的毒力因子。其中 *pla* 基因编码纤溶酶原激活因子；*caf1* 基因编码 F1 抗原，两者都是该菌的重要毒力因子。因此快速检测与分型鼠疫耶尔森菌 *caf1*/*pla* 基因对于鼠疫耶尔森菌的研究具有重要作用。本产品就是以探针法 qRT-PCR 技术为基础开发的专门检测与分型鼠疫耶尔森菌 *caf1* 基因和鼠疫耶尔森菌 *pla* 基因的试剂盒，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，便于排除假阴性结果。
4. 特异性高，引物是根据鼠疫耶尔森菌 *caf1*/*pla* 基因 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
5. 可用于定性检测，不推荐用于定量检测。
6. 两个探针分别用 FAM 和 HEX 标记，检测和分型同时完成。
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

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5 mL 本色盖
荧光 PCR 模板专用稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
鼠疫耶尔森菌 *caf1*/*pla* 基因双重 qPCR 引物-探针干粉	yp15-29420-caf1-pla	50 次	1.5 mL 棕色管
鼠疫耶尔森菌 *caf1* 基因阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc15-29420-caf1	50 μL	0.5 mL 黄盖管
鼠疫耶尔森菌 *pla* 基因阳性对照（1E4 拷贝/μL)	pc15-29420-pla	50 μL	0.5 mL 白盖管
使用手册	sc15-29420-caf1-pla	1 份	无

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 220 μL 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 24 个月。

自备试剂

样品 DNA。

使用方法

一、样品 DNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，最好设置 N+3 个提取，多出的一个是鼠疫耶尔森菌 *caf1* 基因的 PC（样品制备阳性对照），一个是鼠疫耶尔森菌 *pla* 基因的 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 第一步和第二步所得的 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟样本制备试剂盒所要求的起始样本体积一样，以此分别作为两个 PC。另外用水作为 NC，水的总体积需要跟样本制备试剂盒所要求的样本体积一样。
2. 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。

二、Probe qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

3. 做定性分析并且只做 1 次重复，则标记 N+3+3 个 PCR 管，其中 N+3 个用于上步得到的 N+3 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于鼠疫耶尔森菌 *caf1* 基因 PCR 阳性对照，1 个用于鼠疫耶尔森菌 *pla* 基因 PCR 阳性对照（直接用第一步和第二步所得的两个 4 号稀释液作为模板）。
4. 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	鼠疫耶尔森菌 *caf1* 基因 PC	鼠疫耶尔森菌 *pla* 基因 PC
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
鼠疫耶尔森菌 *caf1*/*pla* 基因双重 qPCR 引物-探针混合液	各 4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
N+3 个待测 DNA 样本	各 6 μL	不加	不加	不加
超纯水	不加	6 μL	不加	不加
鼠疫耶尔森菌 *caf1* 基因阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	6 μL	不加
鼠疫耶尔森菌 *pla* 基因阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	6 μL

5. 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℃	10 min
PCR 反应 （45 个循环）	95℃	15 sec
	X℃	X sec
	60℃	60 sec（采集 FAM 通道和 Hex 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

	四、数据处理 6. 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。 7. 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。 8. 对定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照 FAM 通道的 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照 FAM 通道的荧光信号必须有对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于或等于 40。对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 大于或等于 40 则为鼠疫耶尔森菌 *caf1* 基因阴性，如果小于或等于 40 则为鼠疫耶尔森菌 *caf1* 基因阳性。如果其 HEX 通道的 Ct 大于或等于 40 则为鼠疫耶尔森菌 *pla* 基因阴性，如果小于或等于 40 则为鼠疫耶尔森菌 *pla* 基因阳性。
关联产品	鼠疫耶尔森菌可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒