天净沙系列

CAT#:15-29420-caf1-3

低温运输，-20℃保存

天净沙

鼠疫耶尔森菌 caf1/pla/chro392 基因三重探针法 PCR 检测试剂盒

*Yersinia pestis Caf1/Pla/*Chro392 Gene Triplex Probe PCR 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*）是一种革兰氏阴性杆菌，是引起烈性传染病鼠疫的病原体。其强大的致病性依赖于一个复杂的毒力基因网络。其中，*caf1* 基因负责编码 F1 荚膜抗原，形成荚膜结构以抵抗宿主免疫细胞的吞噬作用；*pla* 基因则编码一种血浆纤溶酶原激活剂，是一种重要的胞外蛋白酶，它能高效地降解细胞外基质与凝血系统成分，从而促进细菌在皮下组织中的扩散并引发致命的败血症；而位于染色体上约 392 kb 区域的基因，则在细菌被宿主细胞吞噬后，与细菌在宿主体内的适应、黏附和免疫逃逸等过程密切相关，这些基因共同协调，增强了该菌的致病性。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的相关试剂盒。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，引物和探针分别根据鼠疫耶尔森菌 *caf1*、*pla* 和 chro392 基因高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 或鼠疫耶尔森菌的其他基因发生交叉反应。
5. 本产品只用于定性检测，不推荐用于定量检测。
6. *caf1*、*pla* 和 chro392 基因分别用 Cy5、HEX 和 FAM 标记的三个探针检测。
7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 qPCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用十孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	981201	500 μL	0.5 mL 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
鼠疫耶尔森菌 *caf1*、*pla* 和 chro392 基因 三重 PCR 引物-探针干粉	yp15-29420-caf1-3	50 次	0.5 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 本色管
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 白色管
鼠疫耶尔森菌 chro392 基因 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc15-29420-chro392	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	15-29420-caf1-3sc	1 份	无

注意：在使用前需要短暂离心引物-探针干粉管，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。

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、样品 DNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是样本制备 PC（阳性对照），一个是样本制备 NC（阴性对照）。可以用自备的、确定三个基因为阳性的样本作为样品制备 PC。可以用自备的、确定是阴性的样本作为样品制备 NC，可以用水替代。
2. 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。

二、Probe PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

3. 如果有 N+2 个核酸提取，则设置 N+6 个 PCR 反应，多出的 4 个 1 个用于 PCR NC，另外三个分别用于三个待检测基因的 PCR PC。在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复）：

成分	样品管 N+2 个	PCR NC	*caf1* PC	*pla* PC	chro392 PC
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
鼠疫耶尔森菌 *caf1*、*pla* 和 chro392 基因 三重 PCR 引物-探针溶液	各 3 μL	3 μL	3 μL	3 μL	3 μL
N+2 个待测 DNA	各 7 μL	不加	不加	不加	不加
超纯水	不加	7 μL	不加	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	7 μL	不加	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	7 μL	不加
鼠疫耶尔森菌 chro392 基因 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	不加	不加	7 μL

4. 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）	94℃	30 sec
	55℃	15 sec
	72℃	60 sec（采集 FAM 通道、HEX 通道和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

注意：循环次数不要超过 45 个循环

三、数据分析

	5. 原始数据分析。如果 FAM 通道、HEX 通道和 Cy5 通道的 Ct 大于或等于 40，或者没有 Ct 值，则判为该通道阴性。如果 Ct 小于 40，并且荧光信号呈现倒 S 的典型扩增曲线，则判断为该通道阳性。 6. 实验有效性分析： 6.1、PC：所有 PC 反应应该在对应的通道呈现阳性，如 *caf1* PC 应该为 Cy5 通道阳性，*pla* PC 应该为 HEX 通道阳性。如果样本制备 PC 在其对应的通道为阴性，则整个样本制备实验无效。如果三个基因的 PCR PC 在其对应的通道为阴性（如 *pla* PC 为 HEX 通道阴性），则整个 PCR 扩增实验无效。样本制备无效和扩增实验无效时均不需要分析数据，需要找到原因后再进行后续实验，可能原因包括操作失误、试剂变质或仪器故障。 6.2、NC：样本制备 NC 和 PCR NC 应该在所有通道呈阴性。如果样本制备 NC 或 PCR NC 结果在任何通道为阳性，则整个样本制备和 PCR 扩增实验无效，不需要分析数据，需要找到原因后再进行后续实验。可能原因是环境污染。 6.3、如果 PC 和 NC 均正常，则实验有效，可以对待测样本结果进行分析。 7. 样本结果分析：如果 FAM 通道、HEX 通道和 Cy5 通道的 Ct 大于或等于 40，或者没有 Ct 值，则判为阴性。如果 Ct 小于 40，并且荧光信号呈现倒 S 的典型扩增曲线，则判断为该通道对应的基因阳性。FAM 通道阳性则表示含有 chro392 基因，HEX 通道阳性则表示含有 *pla* 基因，Cy5 通道阳性则表示含有 *caf1* 基因。
关联产品	鼠疫耶尔森菌 *caf1*/*pla*/*chro392* 基因三重染料法荧光定量 PCR 试剂盒