

副溶血弧菌 tdh/tlh/trh 三重探针法荧光定量 PCR 试剂盒

Vibrio parahaemolyticus tdh/tlh/trh Triplex Probe qPCR Kit

目录号: ml107331

使 用 说 明 书

产品及特点

副溶血弧菌(Vibrio parahaemolyticus)属于弧菌科弧菌属,为革兰氏阴性菌,是一种嗜盐性细菌,广泛存在于海水、海底沉积物、海产动物(如鱼、虾、蟹、贝、海蜇等的体表或者肠道内)和盐分含量较高的腌制食品中(如咸菜、腌鱼等)。通过食用这些海鲜动物,副溶血弧菌可以进入食用者的体内,可引发急性肠胃炎、伤口感染和败血症,甚至导致感染者死亡。副溶血弧菌的主要致病因子是耐热直接溶血素(Thermostable Direct Hemolysin, TDH)、不耐热溶血素(Thermolabile Hemolysin, TLH)和耐热直接溶血素相关溶血素(Thermostable Direct Hemolysin-related Hemolysin, TRH),分别由 tdh、tlh 和 trh 基因编码,因此,同时 tdh、tlh 和 trh 基因具有重要意义。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副溶血弧菌 tdh、tlh 和 trh 基因高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 或副溶血弧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. tdh、tlh 和 trh 基因分别用 FAM、HEX 和 ROX 标记的三个探针检测。
7. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法 qPCR 反应。
8. 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 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
副溶血弧菌 tdh、tlh 和 trh 基因三重 PCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 棕色管
副溶血弧菌 tdh 基因阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	50μL	0.5mL 白色管
副溶血弧菌 trh 基因阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	50μL	0.5mL 黄盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用十孔盒包装		
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。		

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（20μL 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	tdhPC	tlhPC	trhPC
2×Probe qPCR MasterMix	各 10μL	10μL	10μL	10μL	10μL
副溶血弧菌 tdh、tlh 和 trh 基因 三重 PCR 引物-探针溶液	各 3μL	3μL	3μL	3μL	3μL
N+2 个待测 DNA	各 7μL	不加	不加	不加	不加
副溶血弧菌 tdh 基因阳性 对照（1×10E4 拷贝/μL）	不加	不加	7μL	不加	不加
副溶血弧菌 tlh 基因阳性 对照（1×10E4 拷贝/μL）	不加	不加	不加	7μL	不加
副溶血弧菌 trh 基因阳性 对照（1×10E4 拷贝/μL）	不加	不加	不加	不加	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℃	10min
PCR 反应 (45 个循环)	94℃	30 sec
	60℃	60 sec（采集 FAM 通道、HEX 通道和 ROX 通道的 荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

四、数据分析

5. 原始数据分析。如果 FAM 通道、HEX 通道和 ROX 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 tdh PC 应该为 FAM 通道阳性，tlh 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 tlh 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 ROX 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 tdh 基因，HEX 通道阳性则表示含有 tlh 基因，ROX 通道阳性则表示含有 trh 基因。
自备试剂	样品 DNA。
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。