

## 梅毒螺旋体(苍白密螺旋体)染料法荧光定量 PCR 试剂盒

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

咨询 QQ : 2881498726

订购热线 : 021 - 54720761

咨询电话 : 13166274233(微信同号)

### 产品及特点:

梅毒螺旋体(苍白密螺旋体)(*Treponema pallidum*)是引起梅毒的病原体，是一种亚种引起的慢性、系统性传播疾病。主要通过性途径传播，临床上可表现为一期梅毒、二期梅毒、三期梅毒、潜伏梅毒和先天梅毒(胎传梅毒)等。女性梅毒潜伏期症状实际上并不明显，一般梅毒螺旋体侵入人体后有 2~3 周的潜伏期。但是经过潜伏期后梅毒的各种症状会逐渐展现。梅毒入侵人体之后通常会有两到三周的潜伏期，临床特征主要为硬下疳，通常比较容易发生于大小阴唇、阴蒂、肛门等部位，也容易见于唇、舌、乳房等部位，因此梅毒螺旋体(苍白密螺旋体)的快速准确鉴定对该病的预防和检疫有着重要作用。荧光定量 PCR 是检测传染性疾病的主流技术，本产品就是以染料法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测梅毒螺旋体(苍白密螺旋体)的试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供病毒样品。
2. 根据梅毒螺旋体(苍白密螺旋体)保守序列设计的专一性引物，与相关病毒无交叉反应。
3. 灵敏度可以达到几百拷贝/反应。
4. 一管式荧光定量 PCR 检测，避免后续污染。
5. 本试剂盒足够 50 次 20 $\mu$ L 反应体系的荧光定量 PCR。

### 规格及成分:

| 编号  | 成分                                                             | 规格           |
|-----|----------------------------------------------------------------|--------------|
| 试剂一 | 2×qPCR MagicMix                                                | 500 μL (棕色管) |
| 试剂二 | 荧光 PCR 专用模板稀释液                                                 | 1 mL (黄盖)    |
| 试剂三 | 梅毒螺旋体(苍白密螺旋体)染料法 PCR 引物混合液                                     | 100 μL (白盖)  |
| 试剂四 | 梅毒螺旋体(苍白密螺旋体)染料法 PCR 阳性对照( $1 \times 10^8$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ) | 50 μL (红盖)   |
| 试剂五 | DNA 病毒裂解液 (试用装)                                                | 15 次 (9 mL)  |
|     | 使用手册                                                           | 1 份          |

## 运输及保存:

低温运输、 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期一年。

## 自备试剂:

DNA 模板、 $10 \times \text{ROX}$  (根据机型决定, 具体见使用方法)。

## 使用方法:

### 一、稀释 PCR 阳性对照 (以 $10^2$ - $10^7$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ 这 6 个 10 倍稀释度为例) :

1. 注意: 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, 只提供可以直接使用的 DNA 片段作为阳性对照。
2. 标记 6 个离心管, 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。
3. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu\text{L}$  荧光 PCR 专用模板稀释液 (最好用带芯枪头, 下同)。
4. 在 7 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照, 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。
6. 换枪头, 在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照到 5 号管中, 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。

7. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。

## 二、样品 DNA 的制备：

8. 如果有 N 个样品，必须设置 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 10 $\mu$ L 上步制备的 PCR 阳性对照的第 4 号（浓度为 1 $\times$ 10E4 拷贝/ $\mu$ L，10 $\mu$ L 相当于 1 万拷贝）或第 5 号（浓度为 1 $\times$ 10E5 拷贝/ $\mu$ L，10 $\mu$ L 相当于 10 万拷贝）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。如果每次制备需要 200 $\mu$ L 样品，则 PC 和 NC 的体积也必须是 200 $\mu$ L。

9. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的一管式病毒 DNAout 或其升级版柱式病毒 DNAout。本试剂盒免费赠送 15 次一管式病毒 DNAout。

## 三、设置 qPCR 反应 (20 $\mu$ L 体系，在样品制备室进行)：

10. 如果只做 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，6 个用于 PCR 阳性对照。如果做 2-3 次重复，则反应设置数量相应增加 2 或 3 倍。

11. 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+2 个  | PCR 阴性 对照管 | PCR 阳性对照管<br>(2-7 管) |
|-----------------------------------|------------|------------|----------------------|
| 2 $\times$ qPCR MagicMix<br>(棕色管) | 10 $\mu$ L | 10 $\mu$ L | 各 10 $\mu$ L         |
| 梅毒螺旋体(苍白密螺旋体) PCR 引物混合液(白盖)       | 2 $\mu$ L  | 2 $\mu$ L  | 各 2 $\mu$ L          |
| 自备 10 $\times$ ROX (见注)           | 2 $\mu$ L  | 2 $\mu$ L  | 各 2 $\mu$ L          |
| N+2 待测样品 DNA                      | 6 $\mu$ L  | 不加         | 不加                   |

| 模板                          |    |    |                                         |
|-----------------------------|----|----|-----------------------------------------|
| 第 7 步所得 PCR 阳性对照稀释液 (2-7 号) | 不加 | 不加 | 各 6 $\mu$ L (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管...) |

**注:** 仅 ABI7500、7700 和 7900 仪器需要使用 ROX 作为对照, 其他荧光 PCR 仪器 (如 iCycler IQ、MJ Option、MJ Chromo4、MX3000、MX4000、RotorGene3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480) 不需要使用 ROX, 则用水替代。

12. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 PCR (具体 PCR 参数可以根据仪器不同而自行优化)。

| 过程                 | 温度   | 时间   |
|--------------------|------|------|
| 预变性                | 92°C | 5 分钟 |
| PCR 反应<br>(30 个循环) | 94°C | 60 秒 |
|                    | 50°C | 60 秒 |
|                    | 72°C | 60 秒 |

#### 13. 数据采集

具体操作按所用仪器推荐的流程进行。本产品中所含的荧光染料在不结合 DNA 时, 最大吸收光谱在 471 nm, 结合 DNA 时的最大吸收光谱在 500 nm, 最大发射光谱在 530 nm。信号采集可以设置在复性或延伸步骤。

#### 四、数据处理:

14. 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 DNA 浓度的 log 值, 再推算出其浓度。

15. 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。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性，如果小于 40，则为阳性。

**所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。**