



# 荧光定量 PCR 军团杆菌检测试剂盒

PCR-Fluorescence Diagnostic Kit for LP  
使用说明书

## 【前言】

嗜肺军团菌肺炎是由军团杆菌引起，多发生在空气湿较大的旅游发达国家，以中、老年男性，尤其是免疫缺陷或应用糖皮质激素治疗的患者发病率高。本病可经呈小暴发流行，潜伏期为 10 天左右。临床类型目前至少有肺炎型与庞蒂阿克热型。本病主要为呼吸道飞沫(气溶胶)传播。目前尚无证据表明感染者、病人或感染动物作为本病的传染源，通常把传染本菌的水源(天然水、人工管道水源、冷却塔、冷热管道系统水等)作为传染源。本试剂盒选用特异性的引物和探针进行扩增杂交，不仅特异性强，而且灵敏度高、操作简便。(供研究使用)。

**【规格】** 50 次，-20℃ 保存，有效期 6 个月

## 【试剂盒组成】

1	核酸提取液	1500ul	5	阴性对照	10ul
			6	定量阳性对照 1 号 $1.0 \times 10^7$ copy/ml	10ul
2	LP-PCR 反应液	1200 $\mu$ l	7	定量阳性对照 2 号 $1.0 \times 10^6$ copy/ml	10ul
3	混合酶	100 $\mu$ l	8	定量阳性对照 3 号 $1.0 \times 10^5$ copy/ml	10ul

## 【适用仪器】

本试剂盒适用于 PE5700、7700、LightCycler、FTC-2000 等荧光定量 PCR 仪。

## 【样本采集和处理】

- 1、如果是痰液标本，则痰液加等体积 1N NaOH，50℃ 消化 30 分钟，取 1ml 消化液 15000rpm/5 分钟离心，沉淀以 1ml 蒸馏水混匀后，再 15000rpm/5 分钟离心，弃上清。沉淀中加入 30 $\mu$ l 裂解液，搅匀 100℃ 沸水浴 10 分钟，最后 15000rpm/5 分钟离心，取 4 $\mu$ l 上清待检。
- 2、如果是水样标本，采集后迅速冷冻保存，处理前解冻，混匀后取 50ml 水样，先 2000rpm 低速离心 2 分钟，然后将上清液转移到另外一个 50ml 离心管中，15000rpm 高速离心 10 分



钟，弃上清，在沉淀中加入 30ul 核酸提取液，然后吹打混匀，然后吸出转移到 1.5ml 离心管中，沸水浴 10 分钟，然后 15000rpm 离心 5 分钟，上清液即可用来做荧光定量 P C R 分析。

### 【试剂准备】

按样品数(样品数=标本数+对照品数+定量阳性对照 3 个) $n$  取 LP-PCR 反应液  $n \times 24\mu\text{l}$ 、混合酶  $n \times 2\mu\text{l}$  混于一离心管中，旋涡振荡器上振荡混匀 10 秒，按每管 26ul 分装于反应管中。将上述处理好的标本上清液和定量阳性对照 1 至 3 号(务必振荡混匀数秒)各取 4ul 分别加入反应管中，混匀，低速离心数秒，立即进行 PCR 扩增反应。

### 【PCR 扩增】

#### ● FTC2000、PE5700、7700、icycler 等荧光仪的程序设置

37°C 反应 2 分钟，然后 94°C 保温 5 分钟，再按 94°C 30 秒→60°C 30 秒循环 40 次。

#### ● lightcycler 荧光仪的程序设置

反应管置于 LightCycler 自动荧光 PCR 仪上，37°C 反应 2 分钟，93°C 2 分钟，再按 93°C 5 秒→60°C 20 秒循环 40 次，每个循环的升降温速率为 20°C/S，每个循环在 60°C 00 秒处进行荧光检测设置。

### 【结果分析与判断】

#### 1、基线设定

##### 1.1 PE5700、7700、FTC2000 等仪器：

分析前把参比荧光定为 TAMRA，如果没有 <16 的强阳性标本，就选 3-15 个循环的平均荧光信号为基线分析；如果有 <16 的强阳性标本，就将此标本定为 LP DNA >10<sup>10</sup> copy/ml，并将此样品从数据库中剔除，再以 3-15 个循环的平均荧光信号为基线再分析。

##### 1.2 iCycler

基线一般按照自设值 (2-10) 即可，在实验结束后，选择 PCR baseline substrat 选项扣除基线值。若某些曲线出现了规则的剧烈的跳动，应视为非正常情况，将其从结果中剔除 (击活



seleHP wells, 将此孔彩色点去, 然后选择 display wells) 并注意调整坐标, 使所有曲线都在坐标以内。

### 1.3 lightcycler

用荧光记数值 F1/F2 读取结果。基线设定原则以超过正常阴性对照扩增曲线的最高点, 且 HP 值不出现任何数值为准 (一般在 0.001-0.05 范围内)。

### 2、阈值设定

以刚好高于阴性对照品的扩增曲线最高点, 且阴性对照品 HP=40 或 0 为原则, 调整起始阈值。



## 上海闪晶分子生物科技有限公司

地址: 上海市北桥吴河路 328 号 A 座 2 楼

邮编: 201109

联系: 市场部

电话: 021-54460832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址: www.shinegene.org.cn