

牛分枝杆菌 PCR 试剂盒

Mycobacterium bovis PCR Kit

使用手册 V1.0

产品及特点	牛分枝杆菌(<i>Mycobacterium bovis</i>)是引起牛结核病的主要病原体，旧称牛型结核分枝杆菌，对牛和其他家畜有致病性。形态、染色和生长特性与人型结核分枝杆菌基本相似。在抗原结构上，牛型菌株与人型菌株有共同抗原存在，因而可用减毒的牛分枝杆菌(即卡介苗)接种预防人的结核病。本菌能引起牛、马、猪的进行性和致死性结核病。对绵羊和山羊也可引起进行性结核病，但不常见。人对本菌也易感，特别是儿童，绝大多数病例受害部位为淋巴结和腹腔器官，肺部受侵害的不常见，因此牛分枝杆菌的检测具有重要的意义。本试剂盒根据PCR 原理开发，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. 产品经过精心优化，分析灵敏性能到达 1000 拷贝/反应。 3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。 4. 特异性高，引物是根据牛分枝杆菌 DNA 高度保守区设计，<i>in silico</i> 分析发现它只能检测牛分枝杆菌，不会跟除此之外的其他生物的 DNA 发生交叉反应。 5. 本产品足够 50 次 20μL 体系的常规 PCR 反应。 6. 本产品只能用于定性实验，不能用于定量实验。 7. 本产品只能用于科研。			
规格及成分	本产品使用五孔盒包装			
	成份	编号	规格	包装
	2×PCR MasterMix (电泳法)	990805	0.5 mL	0.5 mL 本色管
	超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
	牛分枝杆菌 PCR 引物混合液	yw13-67760	100 μL	0.5 mL 白盖管
	牛分枝杆菌 PCR 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	pc13-67760	250 μL	0.5 mL 黄盖管
	使用手册	13-67760sc	1 份	无
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。阳性对照需要单独放置，不要污染其他试剂。			
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，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 10uL 本试剂盒提供的阳性对照（ 1×10^4 拷贝/ μL ）加水作为样本制备的阳性对照，加水后总体积必须跟核酸制备试剂盒所要求的起始样本体积一致。直接用水作为制备的阴性对照。
2. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数细菌 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选用本公司相关的核酸提取试剂盒。

二、设置 PCR 反应（20 μL 体系）

3. 对 N+2 个样品，在 PCR 时需要增加一个 PCR 阳性对照和一个 PCR 阴性对照，故需要设置 N+4 个反应。在 N+4 个 PCR 管中分别加入下列成分：

成分	N+2 个 样品管	PCR 阴性 对照	PCR 阳性 对照
2 $\times$ PCR MasterMix (电泳法)	各 10 μL	10 μL	10 μL
牛分枝杆菌 PCR 引物混合液	各 2 μL	2 μL	2 μL
N+2 个样品 DNA 模板	各 8 μL	-	-
PCR 阴性对照	-	8 μL	-
牛分枝杆菌 PCR 阳性对照 (1×10^4 拷贝/ μL)	-	-	8 μL

4. 按下表设置 PCR 反应：

过程	温度	时间
预变性	94 $^{\circ}\text{C}$	5 min
PCR 反应 (35 个循环)	94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
	55 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
	72 $^{\circ}\text{C}$	60 sec
最后延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	10 min

三、电泳检测

5. 取 10 μL 扩增产物进行常规琼脂糖电泳，检测扩增效果，由于扩增产物较短，建议用 1.5% 的琼脂糖凝胶。
6. 阳性样品预期得到的扩增产物长度为 270bp。如果两个阴性对照（样品制备阴性对照或 PCR 阴性对照）有此扩增产物，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析实验结果。如果所有样品和 PCR 阳性对照均无此扩增产物，则说明有系统性的问题（试剂，设备，程序，操作等），需要重复并排

	查原因。 7. 如果没有上述两种情况，则实验有效，可以分析样品的扩增结果。N+2 个样品中扩增产物的判断为阳性，无则判定为阴性。
关联产品	牛分枝杆菌可视化 LAMP 扩增试剂盒