天
净
沙
系
列

CAT#:13-68000
低温运输, -20℃保存

BINGENE

蜂房蜜蜂球菌 PCR 试剂盒

Melissococcus pluton PCR Kit

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

<p>产品及特点</p>	<p>蜂房蜜蜂球菌 (<i>Melissococcus pluton</i>) 是引起欧洲幼虫腐臭病 (European foulbrood, 简称 EFB) 的病原菌, 该菌单个的形态为披针形, 常结成链状或成簇排列, 直径 0.5 μm~1.0 μm, 是一种革兰氏阳性菌, 但有染色特性不稳定性, 有时候可能为革兰氏阴性菌染色特点, 兼性厌氧。由于欧洲幼虫腐臭病是急性、毁灭性传染病, 能导致蜜蜂幼虫的大批死亡, 最终导致整个蜂群的灭亡, 危害巨大, 是蜜蜂的主要病害。农业部和质检总局联合制定的最新的《中华人民共和国进境动物检疫疫病名录》将其列为二类传染病。世界动物卫生组织 (OIE) 也将其列为检疫对象, 因此快速检测蜂房蜜蜂球菌具有重要的意义。本试剂盒就是为此目的根据 PCR 原理开发, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 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, 便于排除假阴性样品。 4. 特异性高, 引物是根据蜂房蜜蜂球菌 DNA 高度保守区设计, <i>in silico</i> 分析发现它只能检测蜂房蜜蜂球菌, 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。 																								
<p>规格及成分</p>	<p>本产品使用五孔盒包装</p> <table border="1" data-bbox="491 1332 1423 1774"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>规格</th> <th>包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×PCR MasterMix (电泳法)</td> <td>90805</td> <td>0.5 mL</td> <td>0.5 mL 本色管</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>210806</td> <td>1 mL</td> <td>1.5 mL 蓝盖管</td> </tr> <tr> <td>蜂房蜜蜂球菌 PCR 引物混合液</td> <td>yw13-68000</td> <td>100 μL</td> <td>0.5 mL 白盖管</td> </tr> <tr> <td>蜂房蜜蜂球菌 PCR 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)</td> <td>pc13-68000</td> <td>250 μL</td> <td>0.5 mL 黄盖管</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>13-68000sc</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	规格	包装	2×PCR MasterMix (电泳法)	90805	0.5 mL	0.5 mL 本色管	超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管	蜂房蜜蜂球菌 PCR 引物混合液	yw13-68000	100 μL	0.5 mL 白盖管	蜂房蜜蜂球菌 PCR 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	pc13-68000	250 μL	0.5 mL 黄盖管	使用手册	13-68000sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装																						
2×PCR MasterMix (电泳法)	90805	0.5 mL	0.5 mL 本色管																						
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管																						
蜂房蜜蜂球菌 PCR 引物混合液	yw13-68000	100 μL	0.5 mL 白盖管																						
蜂房蜜蜂球菌 PCR 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	pc13-68000	250 μL	0.5 mL 黄盖管																						
使用手册	13-68000sc	1 份	无																						
<p>运输及保存</p>	<p>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。</p>																								
<p>自备试剂</p>	<p>样品 DNA。</p>																								
<p>使用方法</p>	<p>一、样品 DNA 的制备</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 10 μ L 本试剂盒提供的 PCR 阳性对照 (1×10^4 拷贝/ μ L) 加水作为样本制备的阳性对照, 加水后总体积必须跟样本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。

- 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。也可以选用本公司的相关的核酸提取试剂盒。

二、设置 PCR 反应 (20 μ L 体系)

- 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 μ L	10 μ L	10 μ L
蜂房蜜蜂球菌 PCR 引物混合液	各 2 μ L	2 μ L	2 μ L
N+2 个样品 DNA 模板	各 8 μ L	-	-
样品制备阴性对照 (超纯水)	-	8 μ L	-
蜂房蜜蜂球菌 PCR 阳性对照 (1×10^4 拷贝/ μ L)	-	-	8 μ L

- 按下表设置 PCR 反应:

过程	温度	时间
预变性	94 $^{\circ}$ C	5 min
PCR 反应 (35 个循环)	94 $^{\circ}$ C	15 sec
	58 $^{\circ}$ C	15 sec
	72 $^{\circ}$ C	30 sec
最后延伸	72 $^{\circ}$ C	10 min

三、电泳检测

- 取 10 μ L 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。
- 阳性样品预期得到的扩增产物长度为 829bp。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	蜂房蜜蜂球菌可视化 LAMP 扩增试剂盒