

天
净
沙
系
列

CAT#:14-34510

低温运输，-20℃保存

BINGENE

肉毒梭状芽孢杆菌染料法 qPCR 试剂盒

Clostridium botulinum SYBR qPCR 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: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	肉毒梭状芽孢杆菌广泛存在于自然界，是一种专性厌氧的腐生菌，革兰阳性，菌体粗大，具有 4~8 根周毛性鞭毛、运动迟缓，没有荚膜，芽孢卵圆形、近端位、芽孢比繁殖体宽。肉毒梭菌产生的肉毒毒素本质是蛋白质，为神经毒素，共产生六种毒素:A、B、C、D、E、F，其中的 A、B、E、F 与人类的食物中毒有关。肉毒毒素毒性剧烈，少量毒素即可产生症状甚至致死，对人的致死量为 0.1μg。毒素摄入后经肠道吸收进入血液循环，输送到外围神经，毒素与神经有强的亲和力，阻止乙酰胆碱的释放，导致肌肉麻痹和神经功能不全。因此快速检测肉毒梭状芽孢杆菌具有重要意义。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肉毒梭状芽孢杆菌的试剂盒，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. 引物经过优化，灵敏性高，分析灵敏度可以达到 100 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，引物是根据肉毒梭状芽孢杆菌高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。 5. 本产品足够 50 次 20μL 体系的染料法荧光定量 PCR 反应。 6. 既可用于定性，也可用于定量。用于定量时线性范围至少 5 个数量级。 7. 本产品只能用于科研。																															
规格及成分	本产品采用 5 孔盒包装 <table><tr><th>成分</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>2×SYBR qPCR MasterMix</td><td>990408</td><td>0.5 mL</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>180701</td><td>1 mL</td><td>1.5mL 绿盖管</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>210806</td><td>1 mL</td><td>1.5mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>肉毒梭状芽孢杆菌染料法 qPCR 引物混合液</td><td>yp14-25420</td><td>100 μL</td><td>0.5mL 白盖管</td></tr><tr><td>肉毒梭状芽孢杆菌 PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)</td><td>Pc34510</td><td>50 μL</td><td>0.5mL 红盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>14-34510sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>				成分	编号	规格	包装材料	2×SYBR qPCR MasterMix	990408	0.5 mL	0.5mL 棕色管	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5mL 绿盖管	超纯水	210806	1 mL	1.5mL 蓝盖管	肉毒梭状芽孢杆菌染料法 qPCR 引物混合液	yp14-25420	100 μL	0.5mL 白盖管	肉毒梭状芽孢杆菌 PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	Pc34510	50 μL	0.5mL 红盖管	使用手册	14-34510sc	1 份	无
成分	编号	规格	包装材料																													
2×SYBR qPCR MasterMix	990408	0.5 mL	0.5mL 棕色管																													
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5mL 绿盖管																													
超纯水	210806	1 mL	1.5mL 蓝盖管																													
肉毒梭状芽孢杆菌染料法 qPCR 引物混合液	yp14-25420	100 μL	0.5mL 白盖管																													
肉毒梭状芽孢杆菌 PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	Pc34510	50 μL	0.5mL 红盖管																													
使用手册	14-34510sc	1 份	无																													
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。																															
自备试剂	样品 DNA。																															

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以 10E1-10E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例）。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，只提供无传染性的 DNA 片段作为阳性对照。

- 1. 标记 6 个离心管，分别为 6，5，4，3，2，1。
- 2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。
- 3. 在 6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
- 4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
- 5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E4 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
- 6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

- 7. 如果有 N 个样品，最好设置 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 10μL 第 6 步所得的第 4 号稀释液（1×10E4 拷贝/μL）再加上一一定量的水使总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的起始样本体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。
- 8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容，也可使用本公司的免提取核酸释放剂。

三、染料法 qPCR 反应（20μL 体系，在样品制备室进行）

- 9. 如果做定量分析并且只做 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（用水做模板），6 个用于标准曲线。如果做定性分析，并且只做 1 次重复，则标记 N+4 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（用水做模板），1 个用于 PCR 阳性对照（用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
- 10. 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	PCR 阴性	标准曲线
----	-----	--------	------

		N+2 个	对照管	样品管（1-6 管）													
	2×SYBR qPCR MasterMix	10 μL	10 μL	各 10 μL													
	肉毒梭状芽孢杆菌染料法 qPCR 引物混合液	2 μL	2 μL	各 2 μL													
	N+2 个待测 DNA 模板	8 μL	不加	不加													
	超纯水	不加	8 μL	不加													
	第 6 步所得标准曲线样品 稀释液（1-6 号）	不加	不加	各 8μL（2 号样到 2 号管，3 号样到 3 号管…）													
	11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：																
<table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>5 分</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (35 个循环)</td><td>95℃</td><td>10 秒</td></tr><tr><td>60℃</td><td>40 秒（采集 SYBR 通道的荧光信号）</td></tr><tr><td>溶解曲线分析</td><td></td><td>按 qPCR 仪器手册执行</td></tr></table>		过程	温度	时间	预变性	95℃	5 分	PCR 反应 (35 个循环)	95℃	10 秒	60℃	40 秒（采集 SYBR 通道的荧光信号）	溶解曲线分析		按 qPCR 仪器手册执行		
过程	温度	时间															
预变性	95℃	5 分															
PCR 反应 (35 个循环)	95℃	10 秒															
	60℃	40 秒（采集 SYBR 通道的荧光信号）															
溶解曲线分析		按 qPCR 仪器手册执行															
注意：循环次数不要超过 35 个循环。																	
五、数据处理																	
12. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有 Ct 值，但 Tm 值跟阳性对照 Tm 不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，数据无效，不予以分析。Tm 跟阳性对照 Tm 一致的，为有效 Ct。																	
13. 如果两种阴性对照的溶解曲线所得 Tm 值跟阳性对照的 Tm 值一样，说明环境或试剂可能有过去的 PCR 扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。																	
14. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 PCR 阴性对照）是假阳性，可以继续分析其它样品有效数据。																	
15. 对定量检测，以阳性对照样品的浓度的 log 值为横轴，以有效 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再换算出待测样品的 DNA 浓度。																	
16. 对定性检测，则有有效 Ct 值的为阳性，无有效 Ct 值的为阴性。																	
关联产品	肉毒梭状芽孢杆菌荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒																