

天
净
沙
系
列

CAT#:15-18814

低温运输, -20℃保存

BINGENE

嗜热链球菌探针法荧光定量 PCR 试剂盒

Streptococcus thermophilus Probe 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	<p>嗜热链球菌 (<i>Streptococcus thermophilus</i>) 来源于乳制品。它是一种耗氧的革兰氏阳性菌，以两个卵圆型为一对的球菌连成约 0.7 到 0.9 微米的长链。嗜热链球菌也具有一些功能活性，比如生产胞外多糖、细菌素和维生素。另外，嗜热链球菌也可以作为潜在有益菌，实验证明了其具有健康效果、转运活性和一定的胃肠道粘附性。因此对嗜热链球菌的快速准确鉴定有着重要作用。本产品就是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测嗜热链球菌的试剂盒，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. 引物和探针经过优化，灵敏性高。3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。4. 特异性高，引物是根据嗜热链球菌 DNA 高度保守区设计，不会跟其他微生物的 DNA 发生交叉反应。5. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。7. 本产品只能用于科研。		
格及成分	成分	编号	五孔盒包装
	2 \times Probe qPCR MagicMix	190303	500 μ L (本色盖管)
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (绿盖管)
	超纯水	210806	1 mL (蓝盖管)
	嗜热链球菌探针法 qPCR 引物-探针混合液	yp15-18814	150 μ L (棕色管)
	嗜热链球菌探针法 qPCR 阳性对照 (1 \times 10E7 拷贝/ μ L)	pd18814	50 μ L (黄盖管)
	使用手册	15-18814sc	1 份
运输及保存	低温运输，-20 $^{\circ}$ C 保存，保存期限为 12 个月。		
自备试剂	样品 DNA。		
使用方法	<p>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。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。</p> <ol style="list-style-type: none">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 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^6 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 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 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 1×10^5 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^4 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 个样品待提取，最好设置 N+2 个提取，多出的是 PC（样品制备阳性对照）和 NC（样品制备阴性对照）。可以取阳性对照的 1000 倍稀释液 10 μL 再加上一一定量的水，使总体积与待提取样品的规定体积一致，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 DNA 提取试剂盒兼容。

三、Probe qPCR 反应（20 μL 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 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/每管	样品管 N+2 个	PCR 阴性 对照管	标准曲线 样品管 (1-6 管)
2 \times Probe qPCR MagicMix	10 μL	10 μL	10 μL
嗜热链球菌探针法 qPCR 引物-探针混合液	3 μL	3 μL	3 μL
N+2 个待测 DNA 模板	7 μL	-	-
超纯水	-	7 μL	-

	第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	-	-	7 μL (1 号样到 1 号管, 2 号样到 2 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>10 min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (40 个循环)</td><td>95℃</td><td>15 sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 BHQ1)</td></tr></table>				过程	温度	时间	预变性	95℃	10 min	PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15 sec	60℃	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 BHQ1)
过程	温度	时间													
预变性	95℃	10 min													
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15 sec													
	60℃	60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 BHQ1)													
	四、数据处理														
	12. 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核酸浓度的 log 值, 再推算出其浓度。														
	13. 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 35。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。														
关联产品	嗜热链球菌染料法荧光定量 PCR 试剂盒														