

天
净
沙
系
列

CAT#:15-22310

低温运输，-20℃保存

BINGENE

洋葱伯克氏菌探针法 qPCR 试剂盒

Burkholderia cepacia Probe 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: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	洋葱伯克氏菌（Burkholderia cepacia）是革兰氏阴性杆状细胞，具有多根极端鞭毛，能够引起人类肺部囊肿性纤维化感染。本产品是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测洋葱伯克氏菌的试剂盒，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. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/μL。 3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。 4. 特异性高，引物是根据洋葱伯克氏菌 DNA 高度保守区设计，不会跟其他的 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。																					
规格及成分	<table><tr><th>成分</th><th>编号</th><th>五孔盒包装</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MagicMix</td><td>190303</td><td>500μL（本色盖）</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>180701</td><td>1mL（红盖）</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>100935</td><td>1mL（紫盖）</td></tr><tr><td>洋葱伯克氏菌 qPCR 引物-探针混合液</td><td>yp15-22310</td><td>150μL（棕色管）</td></tr><tr><td>洋葱伯克氏菌 qPCR 阳性对照（1×10E7 拷贝/μL）</td><td>pc22310</td><td>50μL（黄盖）</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>15-22310sc</td><td>1 份</td></tr></table>	成分	编号	五孔盒包装	2×Probe qPCR MagicMix	190303	500μL（本色盖）	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL（红盖）	超纯水	100935	1mL（紫盖）	洋葱伯克氏菌 qPCR 引物-探针混合液	yp15-22310	150μL（棕色管）	洋葱伯克氏菌 qPCR 阳性对照（1×10E7 拷贝/μL）	pc22310	50μL（黄盖）	使用手册	15-22310sc	1 份
成分	编号	五孔盒包装																				
2×Probe qPCR MagicMix	190303	500μL（本色盖）																				
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL（红盖）																				
超纯水	100935	1mL（紫盖）																				
洋葱伯克氏菌 qPCR 引物-探针混合液	yp15-22310	150μL（棕色管）																				
洋葱伯克氏菌 qPCR 阳性对照（1×10E7 拷贝/μL）	pc22310	50μL（黄盖）																				
使用手册	15-22310sc	1 份																				
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 45μL 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 5μL 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 5μL 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所																					

- 得),充分震荡 1 分钟,得 1×10^5 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 $5\mu\text{L}$ 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,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 $10\mu\text{L}$ 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样,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。也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qPCR 反应 ($20\mu\text{L}$ 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(直接用第 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 N+2 个	PCR 阴性 对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
$2 \times \text{Probe qPCR MagicMix}$	各 $10\mu\text{L}$	$10\mu\text{L}$	各 $10\mu\text{L}$
洋葱伯克氏菌 qPCR 引物-探针混合液	各 $3\mu\text{L}$	$3\mu\text{L}$	各 $3\mu\text{L}$
N+2 个待测 DNA 样本	各 $7\mu\text{L}$	不加	不加
超纯水	不加	$7\mu\text{L}$	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 $7\mu\text{L}$ (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:

		过程	温度	时间
		预变性	95℃	5 min
		PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec
			60℃	1 min（采集 FAM 通道的荧光信号）
	五、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 DNA 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	洋葱伯克氏菌探针法荧光定量 PCR 检测试剂盒			