

天
净
沙
系
列

CAT#:15-25420

低温运输, -20℃保存

BINGENE

蜡状芽孢杆菌探针法 qPCR 试剂盒

Bacillus cereus 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	芽孢杆菌属(Bacillus)中的一种。菌体细胞杆状，末端方，成短或长链，1.0~1.2×3.0~5.0 微米。产芽孢，芽孢圆形或柱形，中生或近中生，1.0~1.5 微米，孢囊无明显膨大。革兰氏阳性，无荚膜，运动。菌落大，表面粗糙，扁平，不规则。会引起食物中毒，中毒者症状为腹痛、呕吐腹泻。蜡状芽孢杆菌可产生抗菌物质，抑制有害微生物的繁殖，降解土壤中的营养成分，改善生态环境。可产生细菌蛋白酶；可用于麻脱胶，是各种抗生素抗菌活性的测定菌。可用于明胶液化，牛奶胨化，还原硝酸盐，水解淀粉。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蜡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，引物是根据蜡状芽孢杆菌 DNA 高度保守区设计，不会跟其他细菌的 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>蜡状芽孢杆菌 qPCR 引物-探针混合液</td><td>yp15-25420</td><td>150μL（棕色管）</td></tr><tr><td>蜡状芽孢杆菌 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)</td><td>pd25420</td><td>50μL（黄盖）</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>15-25420sc</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）	蜡状芽孢杆菌 qPCR 引物-探针混合液	yp15-25420	150μL（棕色管）	蜡状芽孢杆菌 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pd25420	50μL（黄盖）	使用手册	15-25420sc	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）																						
蜡状芽孢杆菌 qPCR 引物-探针混合液	yp15-25420	150μL（棕色管）																						
蜡状芽孢杆菌 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	pd25420	50μL（黄盖）																						
使用手册	15-25420sc	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/ μ L 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 μ L 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 μ L 1 $\times$ 10E7 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1 $\times$ 10E6 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μ L 1 $\times$ 10E6 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1 $\times$ 10E5 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μ L 1 $\times$ 10E5 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L 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 μ 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 μ 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×Probe qPCR MagicMix	各 10μL	10μL	各 10μL										
	蜡状芽孢杆菌 qPCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL										
	N+2 个待测 DNA 样本	各 7μL	不加	不加										
	超纯水	不加	7μL	不加										
	第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7μL (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><td>过程</td><td>温度</td><td>时间</td></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>5 min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>95℃</td><td>15 sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>1 min (采集 FAM 通道的荧光信号)</td></tr></table>				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)
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	蜡状芽孢杆菌探针法荧光定量 PCR 检测试剂盒													