|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:15-25470****低温运输，-20℃保存** |  |
| **地衣形芽孢杆菌探针法荧光定量PCR试剂盒*****Bacillus licheniformis* 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**](http://www.bingene.com)**；电话：400-6605850；电邮：****order@bingene.com** |
| **产品及特点** | 地衣形芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*, *B.licheniformis*)是一种在土壤中常见的革兰氏阳性嗜热细菌,可调整菌群失调达到治疗目的，可促使机体产生抗菌活性物质、杀灭致病菌。能产生抗活性物质，并具有独特的生物夺氧作用机制，能抑制致病菌的生长繁殖。因此快速检测*B.licheniformis*具有重要意义。荧光定量PCR是检测传染性疾病的主流技术，本产品就是以探针法荧光定量PCR技术为基础开发的专门检测地衣形芽孢杆菌的试剂盒，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，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，引物是根据地衣形芽孢杆菌的高度保守区设计，*in silico*分析发现其不会跟其他禽致病性大肠杆菌血清型的DNA发生交叉反应。
5. 本产品足够50次20μL体系的探针法荧光定量PCR反应。
6. 本产品只能用于科研。
 |
| **规格及成分** |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 成分 | 编号 | 五孔盒包装 |
| 2×Probe qPCR MagicMix | 190303 | 0.5 mL（本色盖） |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 180701 | 1 mL（绿盖） |
| 超纯水(PCR级） | 210806-1 | 1 mL（蓝盖） |
| 地衣形芽孢杆菌探针法qPCR引物-探针混合液 | 15-25470yp | 150 μL（棕色管） |
| 地衣形芽孢杆菌PCR阳性对照 (1×10E7拷贝/μL) | Pc25470 | 50 μL（黄盖） |
| 使用手册 | 15-25470sc | 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**1. 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4号稀释液（第6步所得）再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为样本制备PC。另外用水作为样本制备NC。
2. 用自选方法纯化样品的DNA，本扩增试剂盒跟市场上大多数细菌DNA提取试剂盒兼容。

**三、Probe qPCR反应（20μL体系，在样品制备室进行）**1. 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（可直接用第6步所得的第4号稀释液）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
2. 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阴性对照管** | **标准曲线样品管****（1-6管）** |
| 2×Probe qPCR MagicMix | 10 μL | 10 μL | 各10 μL |
| 地衣形芽孢杆菌探针法qPCR引物-探针混合液 | 3 μL | 3 μL | 各3 μL |
|  N+2个待测DNA模板 | 7 μL | 不加 | 不加 |
| 超纯水 | 不加 | 7 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7μL（1号样到1号管，2号样到2号管…） |

1. 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℃ | 10 min |
| PCR反应（45个循环） | 95℃ | 15 sec |
| 60℃ | 30 sec（采集FAM通道的荧光信号） |

**五、数据处理**1. 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。
2. 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** | 地衣形芽孢杆菌可视化LAMP检测试剂盒 |

20220219w