

CAT#:15-67700

低温运输，-20℃保存

BINGENE

分枝杆菌属通用探针法荧光定量 PCR 试剂盒

Mycobacterium spp. 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: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	分枝杆菌属（<i>Mycobacterium spp.</i>）是一类细长略弯曲的，有时有分枝或出现丝状体的细菌。本属细菌的主要特点是细胞壁含有大量脂质，主要是分枝菌酸。这和其染色性、生长特性、致病性、抵抗力等密切相关。一般不易着色，若经加温或延长染色时间而着色后能抵抗强脱色剂盐酸乙醇的脱色，故又称抗酸杆菌。该菌属无鞭毛、无芽胞、不产生内、外毒素，其致病性和菌体成分有关。引起的疾病都呈慢性，并伴有肉芽肿。分枝杆菌种类较多，对人致病的主要有结核分枝杆菌和麻风分枝杆菌。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分枝杆菌属的试剂盒，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，灵敏性较高。具体的检测灵敏度跟不同的分枝杆菌种相关，一般在 1000 拷贝/μL 左右。 3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。 4. 特异性高，引物是根据分枝杆菌属细菌 DNA 的高度保守区设计。 5. 涵盖广，in silico 分析发现其可以检测 <i>M.tuberculosis</i>, <i>M.avium</i>, <i>M.intracellulare</i>, <i>M. abscessus</i>, <i>M. chelonae</i>, <i>M. fortuitum</i>, <i>M. porcinum</i> 和 <i>M. immunogenum</i> 等分枝杆菌，不会跟其他非分枝杆菌属细菌发生交叉反应。 6. 本产品既可用于定性检测，也可以用于定量检测，用于定量检测时线性范围至少有 5 个数量级。 7. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。 8. 本产品只能用于科研。		
成分	成分	编号	五孔盒包装
	2×Probe qPCR MasterMix	981201	500μL（本色盖）
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL（绿盖）
	超纯水	210806	1mL（蓝盖）
	分枝杆菌通用探针法 qPCR 引物-探针混合液	yp15-67700	150μL（棕色管）
	分枝杆菌通用 PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	Pc67700	50μL（黄盖）
	使用手册	15-67700sc	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 1×10E5 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 5μL 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 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。
8. 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。也可以使用本公司的免提取的核酸释放剂。

三、Probe 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（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。
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 对照管	标准曲线样品管 (1-6 管)
		2×Probe qPCR MagicMix	10μL	10μL	各 10μL
		分枝杆菌通用探针法 qPCR 引物-探针混合液	3μL	3μL	各 3μL
		N+2 个待测 DNA 模板	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：				
	过程	温度	时间		
	预变性	95℃	3 min		
	PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15 sec		
		60℃	60sec (采集 FAM 通道的荧光信 号，淬灭基团为 BHQ3)		
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 必须为零等于 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 35。对待测样品，如果其 Ct 为零或等于 40 则为阴性，如果小于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。重复实验的 Ct 值如果等于 40 则为阴性，如果小于 40，则为阳性。				
关联产品	分枝杆菌属通用可视化 LAMP 检测试剂盒				