|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:15-72200****低温运输，-20℃保存** |  |
| **巨大芽胞杆菌探针法荧光定量PCR试剂盒*****Bacillus megaterium* 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**](http://www.bingene.com)**；电话：400-6605850；电邮：order@bingene.com** |
| **产品及特点** | 巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)属于芽孢杆菌属，是一种好氧产芽孢的革兰氏阳性细菌，菌体直径大于1.0μm，俗称“大芽孢”菌，是一种有益的土壤细菌，具有对环境友好、对粮食作物安全、对人畜无害等优点而受到了人们的普遍关注和深入研究。因此快速检测巨大芽孢杆菌具有重要的意义。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巨大芽胞杆菌的试剂盒。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，灵敏度高，可达到10拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据巨大芽胞杆菌高度保守区设计，不会跟其他病原DNA发生交叉反应。
5. 本产品既可以用于定性实验，又可用于定量实验。用于定量时，其线性范围至少有五个数量级。
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** | 本产品采用五孔盒包装

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **成分** | **编号** | **规格** | **包装材料** |
| 2×Probe qPCR MagicMix | 190303 | 500 μL | 0.5mL本色管 |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 180701 | 1 mL | 1.5mL绿盖管 |
| 超纯水 | 210805 | 1 mL | 1.5mL蓝盖管 |
| 巨大芽胞杆菌探针法qPCR引物-探针混合液 | yp15-72200 | 150 μL | 0.5mL棕色管 |
| 巨大芽胞杆菌探针法qPCR阳性对照(1×10E7拷贝/μL) | pc72200-D10625.1 | 50μL | 0.5mL黄盖管 |
| 使用手册 | 15-72200sc | 1份 | 无 |

 |
| **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PCR阳性对照**（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微生物，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供无危害的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. 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。放冰上用。

**二、样品DNA的制备**1. 如果有N个样品，必须设置N+2个提取，多出的一个是样品制备PC（样品制备阳性对照），一个是样品制备NC（样品制备阴性对照）。可以用10μL阳性对照的10000倍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，以此作为样品制备PC。另外用水作为样品制备NC。
2. 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（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（用第4号管中的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为描述操作步骤，
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 | 10μL | 10μL | 各10μL |
| 巨大芽胞杆菌探针法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…） |

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℃ | 10min |
| qPCR反应（45个循环） | 95℃ | 15sec |
| 60℃ | 1min（采集FAM通道的荧光信号，淬灭基团为TAMRA） |

**四、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45。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40。对待测样品，如果其Ct大于或等于45则为阴性，如果小于或等于40则为阳性。如果在40-45之间，则重复一次。若重复结果Ct值小于45，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。
 |
| **关联产品** | 巨大芽胞杆菌可视化LAMP检测试剂盒 |

20220215dx