

CAT#:15-72200
低温运输, -20℃保存

BINGENE

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; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	巨大芽孢杆菌(<i>Bacillus megaterium</i>)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,引物是根据巨大芽孢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
	巨大芽孢杆菌探针法 qPCR 引物-探针混合液	yp15-72200	150 μL	0.5mL 棕色管
	巨大芽孢杆菌探针法 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)。			

- 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。
- 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。
- 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

- 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。
- 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）

- 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，
- 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…）

- 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	四、数 据 处 理
		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）	
		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 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				