

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:15-90700  
低温运输, -20℃保存

**BINGENE**

嗜麦芽窄食单胞菌探针法荧光定量 PCR 试剂盒

*Stenotrophomonas maltophilia 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](mailto:order@bingene.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>嗜麦芽窄食单胞菌(<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)广泛存在于水, 土壤, 动物体内, 为条件致病菌, 随着临床抗生素和免疫抑制的广泛和大剂量应用其分离率在非发酵菌属中呈上升趋势, 因该菌对多种抗生素耐药, 因而给临床治疗带来很大困难, 对人体健康造成严重损害, 因此快速检测嗜麦芽窄食单胞菌具有重要意义。荧光定量 PCR 是检测传染性疾病的主流技术, 本产品就是以 TaqMan 探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测嗜麦芽窄食单胞菌的试剂盒, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 即开即用, 用户只需要提供样品 DNA 模板。</li> <li>2. 引物和探针经过优化, 分析灵敏性高, 可以达到 100 拷贝/<math>\mu\text{L}</math>。</li> <li>3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。</li> <li>4. 特异性高, 引物是根据嗜麦芽窄食单胞菌 DNA 高度保守区设计, 不会跟其他的 DNA 发生交叉反应。</li> <li>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。</li> <li>6. 本产品足够 50 次 20<math>\mu\text{L}</math> 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。</li> <li>7. 本产品只能用于科研。</li> </ol>																							
<p><b>规格及成分</b></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>五孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×Probe qPCR MagicMix</td> <td>190303</td> <td>500<math>\mu\text{L}</math> (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>嗜麦芽窄食单胞菌探针法 qPCR 引物-探针混合液</td> <td>yp15-90700</td> <td>150<math>\mu\text{L}</math> (棕色管)</td> </tr> <tr> <td>嗜麦芽窄食单胞菌探针法 qPCR 阳性对照(<math>1 \times 10^7</math> 拷贝/<math>\mu\text{L}</math>)</td> <td>pc90700</td> <td>50<math>\mu\text{L}</math> (黄盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>15-90700sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	五孔盒包装	2×Probe qPCR MagicMix	190303	500 $\mu\text{L}$ (本色盖)	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL (红盖)	超纯水	100935	1mL (紫盖)	嗜麦芽窄食单胞菌探针法 qPCR 引物-探针混合液	yp15-90700	150 $\mu\text{L}$ (棕色管)	嗜麦芽窄食单胞菌探针法 qPCR 阳性对照( $1 \times 10^7$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ )	pc90700	50 $\mu\text{L}$ (黄盖)	使用手册	15-90700sc	1 份
成分	编号	五孔盒包装																						
2×Probe qPCR MagicMix	190303	500 $\mu\text{L}$ (本色盖)																						
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL (红盖)																						
超纯水	100935	1mL (紫盖)																						
嗜麦芽窄食单胞菌探针法 qPCR 引物-探针混合液	yp15-90700	150 $\mu\text{L}$ (棕色管)																						
嗜麦芽窄食单胞菌探针法 qPCR 阳性对照( $1 \times 10^7$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ )	pc90700	50 $\mu\text{L}$ (黄盖)																						
使用手册	15-90700sc	1 份																						
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输, <math>-20^{\circ}\text{C}</math> 保存, 保存期限为 12 个月。</p>																							
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>样品 DNA。</p>																							
<p><b>使用方法</b></p>	<p>一、<b>稀释 PCR 阳性对照</b> (以 <math>10^1</math>-<math>10^6</math> 拷贝/<math>\mu\text{L}</math> 这 6 个 10 倍稀释度为例)</p> <p>如果做定性实验, 则此步可以跳过。如果做定量实验, 则需要稀释阳性对照做标准曲线。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。</p>																							

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 $\mu$ 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 $\mu$ L 1 $\times$ 10E7 拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照（试剂盒提供），充分震荡 1 分钟，得 1 $\times$ 10E6 拷贝/ $\mu$ 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 $\mu$ L 1 $\times$ 10E6 拷贝/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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 $\mu$ L 1 $\times$ 10E5 拷贝/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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，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 10 $\mu$ L 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。
8. 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（20 $\mu$ 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（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，
10. 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 $\times$ Probe qPCR MagicMix	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	各 10 $\mu$ L
嗜麦芽窄食单胞菌探针法 qPCR 引物-探针混合液	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L	各 3 $\mu$ L
N+2 个待测 DNA 模板	7 $\mu$ L	不加	不加
超纯水	不加	7 $\mu$ L	不加
第 7 步所得标准曲线样品稀释 液 (1-6 号)	不加	不加	各 7 $\mu$ L (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℃	5min
qPCR 反应 (40 个循环)	95℃	15sec
	60℃	1min (采集 FAM 通道的荧光信号)

#### 四、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 30。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

嗜麦芽窄食单胞菌 qPCR 检测试剂盒