|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:17-45170****低温运输，-20℃保存** |  |
| **缺陷短波单胞菌探针法PCR试剂盒*****Brevendimonas diminuta* 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** | 缺陷短波单胞菌(Brevun dimonas diminuta,BD,前称微小假单胞菌)为革兰染色阴性短小杆菌,菌落特征为灰白色,中心凸起,边缘不整,似草帽状。该菌一般分布于自然界的土壤及河湖中,缺陷短波单胞菌产生的有机磷酸酯水解酶可以水解[有机磷酸酯类](https://baike.baidu.com/item/%E6%9C%89%E6%9C%BA%E7%A3%B7%E9%85%B8%E9%85%AF%E7%B1%BB/15614770%22%20%5Ct%20%22https%3A//baike.baidu.com/item/%E7%BC%BA%E9%99%B7%E7%9F%AD%E6%B3%A2%E5%8D%95%E8%83%9E%E8%8F%8C/_blank)。因此快速灵敏诊断缺陷短波单胞菌具有重要意义。本产品就是以探针法qPCR技术为基础开发的专门检测缺陷短波单胞菌的试剂盒，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，分析灵敏性高，可以达到100拷贝/μL。
3. 提供阳性对照和内参，便于排除假阴性结果。
4. 特异性高，引物是根据缺陷短波单胞菌高度保守区设计，不会跟其他生物的DNA发生交叉反应。
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各数量级。
6. 本产品足够50次20μL体系的探针法PCR反应。
7. 本产品只能用于科研。
 |
| **规格及成分** | 本产品使用五孔盒包装

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 成分 | 编号 | 规格 | 包装材料 |
| 2×Probe PCR MagicMix | 190303 | 0.5 mL | 0.5mL本色管 |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 180701 | 1 mL | 1.5 mL绿盖管 |
| 缺陷短波单胞菌PCR引物-探针混合液（含内参探针） | yp17-45170 | 200 μL | 0.5mL棕色管 |
| 缺陷短波单胞菌PCR阳性对照(1×10E7拷贝/μL) | Pc17-45170 | 50 μL | 0.5mL黄盖管 |
| 缺陷短波单胞菌型PCR内参(1×10E4拷贝/μL) | Icpd17-45170 | 250 μL | 0.5mL白盖管 |
| 使用手册 | 17-45170sc | 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、稀释含内参的标准曲线样品**（以阳性对照10E1-10E6拷贝/μL这6个10倍稀释度和内参固定在10E3拷贝/μL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）。1. 标记6个离心管，分别为6，5，4，3，2，1，0。
2. 在0号管中加入280μL荧光PCR专用模板稀释液，35μL本试剂盒提供的内参，震荡一分钟混匀。
3. 用带芯枪头分别将上步得到的混合液按45μL/管加入到标记的1-6号管中，最好用带芯枪头（下同）。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 重复上面的操作直到得到6个稀释度的标准曲线阳性样品，每个样品中内参的浓度固定为10E3拷贝/μL。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上步所得4号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PC。另外用水作为NC。最后在所有样本中加入5uL 本试剂盒提供的内参（共50000拷贝）。
2. 用自选方法纯化样品的DNA（含内参），本试剂盒跟市场上大多数DNA提取试剂盒兼容，也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

**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（直接用第6步第4号管的阳性对照稀释液做模板）。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）：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **成分** | **样品管****N+2个** | **PCR阴性对照** | **标准曲线样品管****（1-6管）** |
| 2×Probe qPCR MagicMix | 各10 μL | 10 μL | 各10 μL |
| 缺陷短波单胞菌PCR引物-探针混合液(含内参引物) | 各4 μL | 4 μL | 各4 μL |
|  N+2个待测DNA（含内参） | 各6 μL | 不加 | 不加 |
| 超纯水 | 不加 | 6 μL | 不加 |
| 第6步所得标准曲线样品稀释液（含内参，1-6号） | 不加 | 不加 | 各6μL（2号样到2号管，3号样到3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℃ | 3 min |
| PCR反应（45个循环） | 95℃ | 10 sec |
| 60℃ | 60 sec |
| 72℃ | 60 sec（采集FAM通道和Hex通道的荧光信号，淬灭基团均为TAMRA） |

**四、数据处理**1. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系，购买新的引物和探针。对任何阴性样品，如果内参无Ct，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。
2. 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，分别以阳性对照（FAM通道）和内参（HEX通道）的Ct值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照的标准曲线为斜线，r2必须大于0.95，内参的标准曲线为一条跟X轴平行的横线。再以待测样品的Ct值从阳性对照的标准曲线上推算出样品DNA浓度的log值，再推算出其浓度。
3. 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FAM通道的Ct必须大于或等于40。阳性对照FAM通道的荧光信号必须有对数增长，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。对任何FAM通道结果为阴性的样品，如果其对应的内参HEX通道无Ct，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。
 |
| **关联产品** | 缺陷短波单胞菌荧光及可视化LAMP检测试剂盒 |

20220801dx