

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

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。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 <table><tr><th>成分</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>2×Probe PCR MagicMix</td><td>190303</td><td>0.5 mL</td><td>0.5mL 本色管</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>180701</td><td>1 mL</td><td>1.5 mL 绿盖管</td></tr><tr><td>缺陷短波单胞菌 PCR 引物-探针混合液 (含内参探针)</td><td>yp17-45170</td><td>200 μL</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr><tr><td>缺陷短波单胞菌 PCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)</td><td>Pc17-45170</td><td>50 μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>缺陷短波单胞菌型 PCR 内参 (1×10E4 拷贝/μL)</td><td>Icpd17-45170</td><td>250 μL</td><td>0.5mL 白盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>17-45170sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>	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
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 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^6 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 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 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 1×10^5 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^4 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 10^3 拷贝/ μL 。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

8. 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 10 μL 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 5 μL 本试剂盒提供的内参（共 50000 拷贝）。
9. 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（20 μL 体系，在样品制备室进行）

10. 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。
11. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一一次重复）：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性 对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
2 $\times$ 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 6 μL （2 号样 到 2 号管，3 号

			样到 3 号管…)													
12. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：																
<table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>3 min</td></tr><tr><td rowspan="3">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>95℃</td><td>10 sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60 sec</td></tr><tr><td>72℃</td><td>60 sec（采集 FAM 通道和 Hex 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）</td></tr></table>				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）
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																
13. 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。																
14. 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。																
15. 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															