

地衣形芽孢杆菌探针法 qPCR 试剂盒

Bacillus licheniformis Probe PCR Kit

目录号: ml104400

使 用 说 明 书

产品及特点

地衣形芽孢杆菌(Bacillus licheniformis)是一种在土壤中常见的革兰氏阳性嗜热细菌，可调整菌群失调达到治疗目的，可促使机体产生抗菌活性物质、杀灭致病菌。它能产生抗活性物质，并具有独特的生物夺氧作用机制，能抑制致病菌的生长繁殖。因此快速检测地衣形芽孢杆菌具有重要意义。荧光定量 PCR 是检测传染病的主流技术，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地衣形芽孢杆菌的试剂盒，

它有下列特点：

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，可以达到 100 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，引物是根据地衣形芽孢杆菌 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。 5. 既用于定性检测，又用于定量检测。定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。 6. 本产品足够 50 次 20 μL 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	成分	规格	包装
	2×Probe qPCR MasterMix	0.5mL	0.5mL 本色盖
	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
	超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管
	地衣形芽孢杆菌 qPCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 棕色管
	地衣形芽孢杆菌 PCR 阳性对照(1E7 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5mL 黄盖管
	使用手册	1 份	无
	本产品采用五孔盒包装		
	注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。		
使用方法	一、稀释标准曲线样品 (以 1E1-1E6 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。 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 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头，下同。		

3. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1E6 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 5 μL 1E6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E5 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 5 μL 1E5 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E4 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。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

7. 如果有 N 个样品, 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 第 4 号稀释液 (第 6 步所得) 再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样, 以此作为样本制备 PC。另外用水作为样本制备 NC。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA, 本扩增试剂盒跟市场上大多数细菌 DNA 提取试剂盒兼容。

三、Probe qPCR 反应 (20 μL 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 (可直接用第 6 步所得的第 4 号稀释液)。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
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 MasterMix	10 μL	10 μL	各 10 μL

	地衣形芽孢杆菌 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											
	11. 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>10min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>95℃</td><td>15sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60sec（采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA）</td></tr></table>		过程	温度	时间	预变性	95℃	10min	PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15sec	60℃	60sec（采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA）			
过程	温度	时间													
预变性	95℃	10min													
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15sec													
	60℃	60sec（采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA）													
四、数据处理															
12. 如果样本制备阳性对照或 PCR 阳性对照(包括标曲样本)结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据，需要重新样本制备，重新进行 PCR 扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或 PCR 阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系。															
13. 如果阴性对照和阳性对照均正常，则实验有效，可以进入后续分析。															
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，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。															
15. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 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 40，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 40，则为阴性。如果 Ct 小于 40 则为阳性。															
自备试剂	样品 DNA。														
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。														

