

肉毒梭状芽孢杆菌探针法 qPCR 试剂盒

Clostridium botulinum Probe qPCR Kit

目录号: ml108212

使 用 说 明 书

产品及特点

肉毒梭状芽孢杆菌（Clostridium botulinum）又称肉毒梭菌，属于梭状芽孢杆菌属，厌氧性杆菌，革兰氏染色阳性。肉毒梭状芽孢杆菌是一种腐物寄生菌，在自然界广泛分布于土壤、江河湖海淤泥沉积物、尘土及动物粪便中。肉毒梭状芽孢杆菌产生的毒素可引起食物中毒，导致肌肉麻痹、呼吸困难等症状，严重时可致人死亡，对人类的健康造成巨大的威胁。因此快速检测肉毒梭状芽孢杆菌具有重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测肉毒梭状芽孢杆菌的试剂盒，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，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于制备标准曲线和用作扩增对照，排除假阴性结果。

4. 含识别内源性内参的引物和探针，便于排除 PCR 假阴性样本。
5. 特异性高，靶分子的引物和探针是根据肉毒梭状芽孢杆菌 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
6. 既用于定性检测，又用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。
7. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法 PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	500 μ L	0.5mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
肉毒梭状芽孢杆菌 PCR 引物-探针干粉 (含内参引物探针)	50 次	0.5m 白盖管
肉毒梭状芽孢杆菌 PCR 阳性对照(1E7 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5mL 黄盖管
使用手册	1 份	1 份
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 216 μ L 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**（以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/ μ L 这 6 个 10 倍稀释度为例）。
1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。
2. 在各管中加入 45 μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液。
3. 在 6 号管中加入 5 μ L 1E7 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/ μ 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 μ L 1E6 拷贝/ μ L 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阳性样品。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，多出的一个是制备 PC（样品制备阳性对照），一个是制备 NC（样品制备阴性对照）。可以用确认是阳性的样本作为阳性对照，用确认是阴性的样本作为阴性对照。

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，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)

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（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。

10. 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 MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
肉毒梭状芽孢杆菌 PCR 引物-探针混合液 (含内参引物探针)	各 4 μL	4 μL	各 4 μL
N+2 个待测样（含内源性内参）	各 6 μL	不加	不加

超纯水	不加	6 μ L	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 μ L

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°C	4min
PCR 反应 (40 个循环)	95°C	15sec
	60°C	45 sec (采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号, 淬灭基团均为 BHQ)

四、数据处理

12. 阴性阳性判断: 没有 Ct 读数, 或 Ct 大于 40 判为阴性结果。有 Ct 读数, Ct 值小于 40, 荧光信号有对数增长, 有典型扩增曲线判为阳性结果。每个样本需要对 FAM 通道和 Cy5 通道的结果分别进行判定, 得到两个结果。

13. 实验有效性判断: 如果扩增阳性对照或制备阳性对照 FAM 通道结果为阴性则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要分析原因, 可能是操作、仪器和试剂三方面的原因, 重做扩增或制备或跟仪器和试剂厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照 FAM 通道结果为阳性, 说明环境污染, 则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要分析失败原因, 直到污染消除。如果阳性对照和阴性对照正常, 则进入下一步分析样本的有效性。

14. 样本有效性判断: 如果样本 FAM 通道的结果为阳性, 则无论内参 Cy5 通道的结果是阴性还是阳性, 样本的结果均有效。如果样本结果为阴性, 内参通道结果也为阴性, 则此样品的阴性结果无效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。

15. 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 Cy5 通道的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线为斜线，r^2 必须大于 0.95，内参 Cy5 通道读数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 FAM 通道读数的标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。 16. 如果用于定性实验，对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 没有读数、或 Ct 大于或等于 40 则均为阴性，如果小于 40 则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的待测样本，如果其对应的内参 Cy5 通道也为阴性，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。
自备试剂	样品 DNA。
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。