天净沙系列

CAT#:15-34530-4

低温运输，-20℃保存

天净沙

艰难梭菌 *tcdA/tcdB/cdtA/cdtB* 四重探针法 PCR 试剂盒

Clostridium difficile tcdA/tcdB/cdtA/cdtB Quadruplex Probe PCR Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

艰难梭状芽孢杆菌(*Clostridium difficile*) 是一种革兰阳性厌氧芽孢杆菌，也常被称为艰难梭菌。这种细菌有非产毒菌株和产毒菌株之分，其中非产毒菌株由于不产生毒素，所以不具备致病性。正常情况下，人体肠道内有稳定的菌群生态。当某些因素（如长期使用抗生素、免疫功能低下等）破坏了肠道正常菌群的平衡，艰难梭状芽孢杆菌中的产毒菌株就会趁机大量繁殖。这些产毒菌株会释放毒素，从而引发感染。艰难梭状芽孢杆菌的主要毒素基因是 *tcdA*、*tcdB*、*cdtA* 和 *cdtB*。因此，对艰难梭菌四种毒素基因的检测具有重要意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的相关试剂盒。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，便于排除假阴性结果。
4. 特异性高，引物和探针分别根据艰难梭菌 *tcdA*、*tcdB*、*cdtA* 和 *cdtB* 基因高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 或艰难梭菌的其他基因发生交叉反应。
5. 本产品只用于定性检测，不推荐用于定量检测。
6. *tcdA*、*tcdB*、*cdtA* 和 *cdtB* 基因分别用 FAM、HEX、ROX 和 Cy5 标记的四个探针检测。
7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 qPCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用十孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	981201	500 μL	0.5 mL 红盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
艰难梭菌 *tcdA*、*tcdB*、*cdtA* 和 *cdtB* 基因 PCR 引物-探针干粉	yp15-34530-4	50 次	0.5 mL 棕色管
艰难梭菌 *tcdA* 基因阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	pc15-34530tcdA	50 μL	0.5 mL 本色管
艰难梭菌 *tcdB* 基因阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	pc15-34530tcdB	50 μL	0.5 mL 白盖管
艰难梭菌 *cdtA* 基因阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	pc15-34530cdtA	50 μL	0.5 mL 蓝盖管
艰难梭菌 *cdtB* 基因阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	pc15-34530cdtB	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	15-34530sc	1 份	无

注意：在使用前需要短暂离心引物-探针干粉管，然后在离心管中加入 165 μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。

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、样品 DNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是样本制备 PC（阳性对照），一个是样本制备 NC（阴性对照）。可以用自备的、确定四个基因为阳性的样本作为样品制备 PC。可以用自备的、确定是阴性的样本作为样品制备 NC，可以用水替代。

2. 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。

二、Probe PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

3. 如果有 N+2 个核酸提取，则设置 N+7 个 PCR 反应，多出的 5 个 1 个用于 PCR NC，另外四个分别用于四个待检测基因的 PCR PC。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 NC	*tcdA* PC	*tcdB* PC	*cdtA* PC	*cdtB* *PC*
2×Probe qPCR MasterMix	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
艰难梭菌 *tcdA*、*tcdB*、*cdtA* 和 *cdtB* 基因 PCR 引物-探针溶液	3 μL	3 μL	3 μL	3 μL	3 μL	3 μL
N+2 个待测 DNA	7 μL	不加	不加	不加	不加	不加
超纯水	不加	7 μL	不加	不加	不加	不加
艰难梭菌 *tcdA* 基因 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	7 μL	不加	不加	不加
艰难梭菌 *tcdB* 基因 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	不加	7 μL	不加	不加
艰难梭菌 *cdtA* 基因 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	不加	不加	7 μL	不加
艰难梭菌 *cdtB* 基因 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	不加	不加	不加	7 μL

4. 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℃	10 min
PCR 反应 （45 个循环）	94℃	30 sec
	60℃	60 sec（采集 FAM 通道、HEX 通道、ROX 通道的荧光信号和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

三、数据分析

5. 原始数据分析。如果 FAM 通道、HEX 通道、ROX 通道和 Cy5 通道的 Ct 大于或等于 40，或者没有 Ct 值，则判为该通道阴性。如果 Ct 小于 40，并且荧光

	信号呈现倒 S 的典型扩增曲线，则判断为该通道阳性。 6. 实验有效性分析： 6.1、PC：所有 PC 反应应该在对应的通道呈现阳性，如 *tcdA* PC 应该为 FAM 通道阳性，*tcdB* PC 应该为 HEX 通道阳性。如果样本制备 PC 在其对应的通道为阴性，则整个样本制备实验无效。如果四个基因的 PCR PC 在其对应的通道为阴性（如 *tcdB* PC 为 HEX 通道阴性），则整个 PCR 扩增实验无效。样本制备无效和扩增实验无效时均不需要分析数据，需要找到原因后再进行后续实验，可能原因包括操作失误、试剂变质或仪器故障。 6.2、NC：样本制备 NC 和 PCR NC 应该在所有通道呈阴性。如果样本制备 NC 或 PCR NC 结果在任何通道为阳性，则整个样本制备和 PCR 扩增实验无效，不需要分析数据，需要找到原因后再进行后续实验。可能原因是环境污染。 6.3、如果 PC 和 NC 均正常，则实验有效，可以对待测样本结果进行分析。 7. 样本结果分析：如果 FAM 通道、HEX 通道、ROX 通道和 Cy5 通道的 Ct 大于或等于 40，或者没有 Ct 值，则判为阴性。如果 Ct 小于 40，并且荧光信号呈现倒 S 的典型扩增曲线，则判断为该通道对应的基因阳性。FAM 通道阳性则表示含有 *tcdA* 基因，HEX 通道阳性则表示含有 *tcdB* 基因，ROX 通道阳性则表示含有 *cdtA* 基因，Cy5 通道通道阳性则表示含有 *cdtB* 基因。
关联产品	艰难梭状芽孢杆菌探针法 qPCR 试剂盒（不含内参）