天净沙系列

CAT#:15-25470

低温运输，-20℃保存

天净沙

# 地衣形芽孢杆菌探针法 qPCR 试剂盒

# *Bacillus licheniformis* Probe PCR Kit

## 使用手册 V1.0

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

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 是检测传染性疾病的主流技术，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，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

本产品使用五孔盒包装

| 成分 | 编号 | 规格 | 包装 |
|---|---|---|---|
| 2×Probe qPCR MasterMix | 981201 | 0.5 mL | 0.5 mL 本色盖 |
| 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 180701 | 1 mL | 1.5 mL 绿盖管 |
| 超纯水 | 210806 | 1 mL | 1.5 mL 蓝盖管 |
| 地衣形芽孢杆菌 qPCR 引物-探针干粉 | yp15-25470sf | 50 次 | 0.5 mL 棕色管 |
| 地衣形芽孢杆菌 PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL) | pc25470-DQ309295 | 50 μL | 0.5 mL 黄盖管 |
| 使用手册 | 15-25470sc | 1 份 | 无 |

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 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、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。<br>1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。<br>2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。<br>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。<br>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。<br>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。<br>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。<br>**二、样品 DNA 的制备**<br>7. 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 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。<br>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。<br>**三、Probe qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）**<br>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。<br>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最后加）： |

| 成分 | 样品管<br>N+2 个 | PCR 阴性<br>对照管 | 标准曲线样品管<br>(1-6 管) |
|---|---|---|---|
| 2×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 | 3 μL | 3 μL | 各 3 μL |
| N+2 个待测 DNA 模板 | 7 μL | 不加 | 不加 |
| 超纯水 | 不加 | 7 μL | 不加 |
| 第 6 步所得标准曲线样品稀释液（1-6 号） | 不加 | 不加 | 各 7 μL（1 号样到 1 号管，2 号样到 2 号管…） |

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℃ | 10 min |
| PCR 反应<br>(40 个循环) | 95℃ | 15 sec |
| | 60℃ | 60 sec (采集 FAM 通道的荧光信号，设置 TAMRA 为淬灭基团) |

注：部分（如：伯乐 CFX96）机型如果两步法效果不理想可采用三步法： 95℃ 10 分钟，(94℃ 15 秒、60℃ 15 秒、72℃ 30 秒）循环 35-45 次，每个循环第三步采集荧光信号。

**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。

| | |
|---|---|
| **关联产品** | 地衣形芽孢杆菌可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒 |