天净沙系列

CAT#:17-25450-resiD

低温运输，-20℃保存

天净沙

枯草芽孢杆菌细胞基因组 DNA 残留探针法 qPCR 试剂盒（含内参）

Bacillus subtilis Cell Residual Genomic DNA Probe qPCR 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

枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*，*B.subtilis*）是芽孢杆菌属的一种，是革兰氏阳性菌。其生长、繁殖速度较快，菌落表面粗糙不透明，呈污白色或微黄色，在液体培养基中生长时，常形成皱醭。由于枯草芽孢杆菌常被用于工业发酵，其基因组 DNA 残留可能引发免疫反应或干扰下游应用；在生物制品中，残留 DNA 可能影响药品的安全性和稳定性，对工业生产和科研都带来了困扰。因此快速检测枯草芽孢杆菌细胞基因组 DNA 残留具有重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测枯草芽孢杆菌细胞基因组 DNA 残留的试剂盒，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 459 fg/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 假阴性结果。
5. 特异性高，靶分子的引物和探针是根据枯草芽孢杆菌细胞基因组 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。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 μL 体系的探针法 PCR 反应。
8. 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	500 μL	0.5 mL 本色管
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
枯草芽孢杆菌细胞基因组 DNA 残留 qPCR 引物-探针干粉（含内参引物探针）	yp17-25450-resiD	50 次	0.5 mL 棕色管
枯草芽孢杆菌细胞基因组 DNA 残留 qPCR 阳性对照（45.9 ng/μL）	pc25450-resiD	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	sc17-25450-resiD	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 220 μL 超纯水充分混匀后得到引物-探针混合液再使用，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。

自备物品

样品 DNA。

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以阳性对照 45.9 ng-459 fg/μL 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. 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。
3. 在 6 号管中加入 5 μL 1×45.9 ng/μL 的阳性对照（试剂盒提供），充分震荡 1 分钟，得 1×4.59 ng/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 1×4.59 ng/μL 的阳性对照（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 459 pg/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 重复上面的操作直到得到从 45.9 ng-459 fg/μL 共 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

6. 如果有 N 个样品，最好设置 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。
7. 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）

8. 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 5 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。
9. 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
枯草芽孢杆菌细胞 基因组 DNA 残留 qPCR 引物-探针混合液 (含内参引物探针)	各 4 μL	4 μL	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 μL	不加
第 5 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…）

10. 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 （40 个循环）	95℃	15 sec
	52℃	15 sec
	72℃	30 sec（采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA 和 BHQ）

四、数据处理

11. 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。
12. 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。
13. 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。
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 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，r2 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。
15. 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。

关联产品	大肠杆菌细胞基因组 DNA 残留探针法 qPCR 试剂盒（含内参）