天净沙系列

CAT#:15-34590

低温运输，-20℃保存

天净沙

产气荚膜梭状芽孢杆菌探针法 qPCR 试剂盒

Clostridium perfringens 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

产气荚膜梭状芽孢杆菌（*Clostridium perfringens*）又名魏氏梭菌，为梭状芽胞杆菌属，是厌氧、无动力、能产生芽胞的革兰氏阳性粗大杆菌。根据外毒素的性质和致病性不同可将产气荚膜梭状芽孢杆菌分为 A、B、C、D、E 和 F 共 6 型。对人有致病性的主要是 A、C、F 三型，另外三型主要对动物致病。这六型产气奖膜杆菌在形态上相同，生长性状类似，主要区别是毒素性状，免疫原性和致病作用不同。产气荚膜梭状芽孢杆菌的流行给人类的生活带来很大的困扰，因此快速检测产气荚膜梭状芽孢杆菌具有重要意义。本产品是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测产气荚膜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，引物是根据产气荚膜梭状芽孢杆菌 DNA 高度保守区设计，不会跟其他病原菌的 DNA 发生交叉反应。
5. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。
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 本色管
荧光 PCR 模板专用稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
产气荚膜梭状芽孢杆菌 qPCR 引物-探针干粉	yp15-34590-lb	50 次	0.5 mL 棕盖管
产气荚膜梭状芽孢杆菌 qPCR 阳性对照（1E7 拷贝/μL）	pc34590-MH900563-plc	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	sc15-34590	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。

自备物品

超纯水，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。

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 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，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 上步所得 4 号稀释液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 PC。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品 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。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 N+3 个	RT-PCR 阴性对照	标曲样品管 (1-6)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
产气荚膜梭状芽孢杆菌 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
待测样本 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℃	5 min
PCR 反应（35 个循环）	95℃	15 sec
	60℃	60 sec（采集 FAM 通道，淬灭基团为 TAMRA）

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℃ 5 分钟，（95℃ 15 秒、54℃ 15 秒、72℃ 30 秒）循环 35 次，每个循环第三步采集荧光信号。

四、数据处理

12. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系，购买新的引物和探针。
13. 如果阴性对照和阳性对照正常，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 35。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 35，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 35，则为阴性。如果 Ct 小于 35 则为阳性。

关联产品	产气荚膜梭状芽孢杆菌可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒