天净沙系列

CAT#:17-67890-rpoB-1

低温运输，-20℃保存

天净沙

结核分枝杆菌 rpoB 基因 1349C>T（S531L）位点探针法 PCR 分型试剂盒

使用手册 V0.51

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

结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*，MTB）rpoB 基因全长 3519 bp，编码 1172 个氨基酸，是抗结核一线药物利福平的作用靶点。该基因的突变是导致利福平耐药的主要原因，其中 1349C>T（S531L）位点突变最为常见。因此对该位点进行分型具有重要意义，为此本公司开发了本分型试剂盒，它有下列特点：

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 1000 拷贝/μL。
3. 分辨率高，能检测出 5%的点突变。
4. 一管式检测，野生型探针用 FAM 标记，突变型探针用 Cy5 标记。
5. 同时提供野生型和突变型两种阳性对照，便于排除假阴性样品。
6. 特异性高，引物和探针是根据 MTB rpoB 基因 1349C>T 位点设计，不会跟其他突变发生交叉反应。
7. 本产品只能定性，不能定量。
8. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的点突变探针法荧光定量 PCR 反应。
9. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe Typing PCR MasterMix	251201	0.5 mL	0.5 mL 本色管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
MTB rpoB 1349CT 分型引物-探针混合液干粉	yp15-67890-rpoB-1	50 次	0.5 mL 白盖管
MTB rpoB 1349C 阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	pc67890-rpoB-1349c	250 μL	1.5 mL 棕色管
MTB rpoB 1349T 阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	pc67890-rpoB-1349t	250 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	sc17-67890-rpoB-1	1 份	无

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，则进行 N 次纯化，得到的 DNA 最后溶解在 TE 中，并需要用 NanoDrop 进行定量。最后的浓度不能低于 0.2 μg/μL。
2. 本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。

二、点突变 Probe qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

3. 首次使用本试剂盒前，需要在引物-探针干粉管中加入 220 μL 的超纯水，震荡混匀后得引物-探针混合液，放冰上待用。一次实验没用完剩下的需要放-20℃保存。
4. 如果只做 1 次重复，则标记 N+3 个 PCR 管，其中 N 个用于上步得到的 N 样品，1 个用于扩增阴性对照（ANC，用水做模板），2 个用于扩增阳性对照（APC）。
5. 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 ANC 设置完毕后才设置 APC，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子后最后加）：

成分	N 个 样品管	ANC 管	C 型 APC 管	T 型 APC 管
2×Probe Typing PCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
MTB rpoB 1349CT 分型 引物-探针混合液	各 4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
N 个 DNA 样本	各 6 μL	不加	不加	不加
超纯水	不加	6 μL	不加	不加
MTB rpoB 1349C 阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	不加	不加	6 μL	不加
MTB rpoB 1349T 阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	6 μL

6. 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℃	90 sec
PCR 反应 （45 个循环）	95℃	15 sec
	52℃	15 sec.
	60℃	60 sec（采集 FAM 和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

三、数据处理

7. 实验有效性的判断：首先分析 ANC 是否有 FAM 或/和 Cy5 信号，如果有则表示实验污染，本次实验无效，无需分析所有实验数据，需要寻找原因。如果无则表示实验没有污染，再分析 2 个 APC。如果 C 型 APC 没有 FAM 扩增信号（有标准的倒 S 扩增曲线，下同），或 T 型 APC 没有 Cy5 扩增信号，则本次实验无效，不需要分析样本的数据，需要分析失败原因。如果 2 个 APC 正常（C 型 APC 有 FAM 扩增信号，T 型 APC 有 Cy5 扩增信号），则实验有效，可以分析样本的数据。
8. 先根据 Ct 值判断每个样本在 FAM 和 Cy5 两个通道的扩增情况。如果 FAM 通道的 Ct 低于 35，则算 FAM 信号有扩增。如果 Ct 大于 35 或没有 Ct，则算 FAM 通道无扩增。Cy5 通道也如此操作。然后根据扩增结果按下表判断每个样本的基因型，

得到无效数据的样本需要重复：

FAM 通道	Cy5 通道	分型
有扩增	无扩增	C 型
有扩增	有扩增	C 型/T 型混合
无扩增	有扩增	T 型
无扩增	无扩增	无效，需要重复

关联产品	结核分支杆菌 katG 基因点突变探针法 PCR 分型试剂盒