天净沙系列

CAT#:15-25420-3

低温运输，-20℃保存

天净沙

蜡样芽孢杆菌 cesB/nheB/hblC 基因三重探针法 PCR 试剂盒

Bacillus cereus cesB/nheB/hblC Gene Triplex Probe PCR Kit

使用手册 V1.01

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

蜡样芽孢杆菌（Bacilluscereus），又称仙人掌杆菌，是一种革兰氏阳性菌，β溶血性的杆状细菌。蜡样芽孢杆菌是引起食物中毒的常见细菌，临床表现有两种类型：呕吐型和腹泻型。腹泻型毒素至少由 5 类毒力因子构成:溶血性肠毒素 HBL(*hbl*，包括 A、B、C、D 几种)、非溶血性肠毒素 Nhe(*nhe*，有 A、B、C 三种)、细胞毒素 K(*cytK*)、肠毒素 T(*bceT*)、肠毒素 FM(*entFM*)以及由 *cesB* 基因编码的呕吐型毒素。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蜡样芽孢杆菌 *cesB*、*nheB* 和 *hblC* 基因高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 或蜡样芽孢杆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. *cesB*、*nheB* 和 *hblC* 基因分别用 Cy5、HEX 和 FAM 标记的三个探针检测。
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 本盖管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
蜡样芽孢杆菌 *cesB*、*nheB* 和 *hblC* 基因三重 PCR 引物-探针干粉	yp15-25420-3	50 次	0.5 mL 棕色管
蜡样芽孢杆菌 *cesB* 基因阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc15-25420-cesB	50 μL	0.5 mL 红色管
蜡样芽孢杆菌 *nheB* 基因阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc15-25420-nheB	50 μL	0.5 mL 白色管
蜡样芽孢杆菌 *hblC* 基因阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc15-25420-hblC	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	15-25420-3sc	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、确定三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+4 个 PCR 反应，多出的 2 个 1 个用于 PCR NC，另外 1 个分别用于三个待检测基因的混合 PCR PC（将提供的三种样品按 1:1:1 混合）。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	*PCR* PC
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL
蜡样芽孢杆菌 *cesB*、*nheB* 和 *hblC* 基因 三重 PCR 引物-探针溶液	各 3 μL	3 μL	3 μL
N+2 个待测 DNA	各 7 μL	不加	不加
超纯水	不加	7 μL	不加
蜡样芽孢杆菌混合 阳性对照（1E4 拷贝/μL）	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℃	3 min
PCR 反应 （45 个循环）	95℃	15 sec
	50℃	30 sec
	72℃	60 sec（采集 FAM 通道、HEX 通道和 Cy5 通道的荧光信号）

三、数据分析

5. 原始数据分析。如果 FAM 通道、HEX 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 *cesB* 对应为 Cy5 通道阳性，*nheB* 对应为 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。如果三个基因的 PCR PC 在其对应的通道为阴性（如 *nheB* 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 *hblC* 基因，HEX 通道阳性则表示含有 *nheB* 基因，Cy5 通道阳性则表示含有 *cesB* 基因。
关联产品	蜡样芽孢杆菌 *cesB*/*nheB*/*hblC* 基因三重染料法荧光定量 PCR 试剂盒