天净沙系列

CAT#:15-32110-sea-5

低温运输，-20℃保存

天净沙

金黄色葡萄球菌肠毒素基因 *sea/seb/sec/sed/see* 探针法 PCR 分型试剂盒

Staphylococcus aureus Enterotoxin Genes *sea/seb/sec/sed/see* Probe PCR Typing 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

本产品是针对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA) *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see* 五个肠毒素基因，以探针法 PCR 技术为基础开发的分型试剂盒，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，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物根据 SA 的 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
5. 可以用于分型，两管式扩增，一次能区分 5 种 SA 肠毒素基因。
6. 本产品主要用于定性检测和分型，不建议用于定量。分型后可以再另购定量试剂盒。
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

本产品使用十一孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×探针法多重 PCR 预配液	240105	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 绿色盖
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝色盖
SA *seb*、*sec*、*sed* 探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉	yp15-32110-sea-5pt1	50 次	0.5 mL 棕色盖
SA *sea*、*see* 探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉	yp15-32110-sea-5pt2	50 次	0.5 mL 棕色盖
SA *sea* 基因阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc32110-MN752206-sea	50 μL	0.5 mL 黄色盖
SA *seb* 基因阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc32110-KX168631-seb	50 μL	0.5 mL 黄色盖
SA *sec* 基因阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc32110-MT912551-sec	50 μL	0.5 mL 黄色盖
SA *sed* 基因阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc32110-CP051964-sed	50 μL	0.5 mL 黄色盖
SA *see* 基因阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc32110-M21319-see	50 μL	0.5 mL 黄色盖
使用手册	15-32110-sea-5sc	1 份	无

注意：在使用前需要短暂离心引物-探针干粉管，然后分别在两只引物-探针混合液干粉离心管中各加入 275 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+6 个提取，多出的五个是已知为 *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see*

基因阳性的 PPC（样品制备阳性对照），一个是 PNC（样品制备阴性对照），可以用自备的、确定是阴性的样本作为 PNC，也可以用水替代。

2. 用自选方法纯化样品的 DNA。本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的核酸纯化试剂盒。

二、设置 *seb*、*sec*、*sed* 三重 Probe PCR 反应（20 μL 体系）

3. 如果每个样本只做 1 次重复，则需要标记（N+6）+ 4 个 PCR 管，多出的四个中三个用于 *seb*、*sec*、*sed* 基因的 APC（PCR 扩增阳性对照），一个用于 ANC（PCR 扩增阴性对照）。分别在各管加入：

成分	样品管 N+6 个	ANC	*seb APC*	*sec* APC	*sed* APC
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
SA *seb*、*sec*、*sed* 探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉	各 5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 1.6 μL	不加	不加	不加	不加
超纯水	各 3.4 μL	5 μL	3.4 μL	3.4 μL	3.4 μL
SA *seb* 基因 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	1.6 μL	不加	不加
SA *sec* 基因 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	1.6 μL	不加
SA *sed* 基因 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	不加	1.6 μL

四、设置 *sea*、*see* 双重 Probe PCR 反应（20 μL 体系）

4. 如果每个样本只做 1 次重复，则需要标记（N+6）+ 3 个 PCR 管，多出的三个中两个用于 *sea*、*see* 基因的 APC，一个用于 ANC。分别在各管加入：

成分	样品管 N+6 个	ANC	*sea* APC	*see* APC
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
SA *sea*、*see* 探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉	各 5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 2.5 μL	不加	不加	不加
超纯水	各 2.5 μL	5 μL	2.5 μL	2.5 μL
SA *sea* 基因 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	2.5 μL	不加
SA *see* 基因 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	2.5 μL

五、Probe PCR 反应（20 μL 体系）

5. 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 （45 个循环）	95℃	15 sec
	60℃	对 *seb*、*sec*、*sed* 三重 PCR，设置 60 sec（采集 FAM、VIC、ROX 三个通道的荧光信号，淬灭基团分别为 MGB） 对 *sea*、*see* 双重 PCR，设置 60 sec（采集 FAM、VIC 两个通道的荧光信号，淬灭基团分别为 MGB）

五、数据处理

6. 如果 PPC 和 APC 结果均为阴性，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 PNC 或 ANC 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。
7. 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。
8. 对定性检测，只判断阳性或阴性。

***seb*、*sec*、*sed* 结果判定**		
FAM	Ct 值小于或等于 44	*seb* 基因阳性
	Ct 值大于 44	*seb* 基因阴性
VIC	Ct 值小于或等于 35	*sec* 基因阳性
	Ct 值大于 35	*sec* 基因阴性
ROX	Ct 值小于或等于 45	*sed* 基因阳性
	Ct 值大于 45	*sed* 基因阴性

***sea*、*see* 结果判定**		
FAM	Ct 值小于或等于 38	*sea* 基因阳性
	Ct 值大于 38	*sea* 基因阴性
VIC	Ct 值小于或等于 38	*see* 基因阳性
	Ct 值大于 38	*see* 基因阴性

关联产品	金黄色葡萄球菌染料法 qPCR 试剂盒