天净沙系列

CAT#:15-SRB-2

低温运输，-20℃保存

天净沙

硫酸盐还原菌 *dsrA*/*dsrB* 基因双重探针法 PCR 试剂盒

Sulfate-Reducing Bacteria dsrA/*dsrB* Gene Duplex Probe PCR 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

本产品就是以探针法 PCR 技术为基础开发的专门检测硫酸盐还原菌 *dsrA* 基因和硫酸盐还原菌 *dsrB* 基因的试剂盒，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 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，引物是根据硫酸盐还原菌 *dsrA*/*dsrB* 基因 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
5. 可用于定性检测，不推荐用于定量检测。
6. 两个探针分别用 FAM 和 HEX 标记，检测和分型同时完成。
7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
8. 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 PCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5 mL 本色盖
荧光 PCR 模板专用稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
SRB *dsrA*/*dsrB* 基因双重 PCR 引物-探针干粉	yp15-SRB-2	50 次	1.5 mL 棕色管
SRB *dsrA* 基因 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc15-SRB-dsrA	50 μL	0.5 mL 黄盖管
SRB *dsrB* 基因 阳性对照（1E4 拷贝/μL)	pc15-SRB-dsrB	50 μL	0.5 mL 白盖管
使用手册	sc15-SRB-2	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 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 24 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+3 个提取，多出的一个是 SRB *dsrA* 基因的 PC（样品制备阳性对照），一个是 SRB *dsrB* 基因的 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免提取核酸释放剂。

二、Probe PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

3. 如果每个样本只做 1 次重复，则标记 N+3+3 个 PCR 管，其中 N+3 个用于上步得到的 N+3 个样品，多出的三个 2 个用于 *dsrA/dsrB* 基因的 APC（PCR 扩增阳性对照），1 个用于 ANC（PCR 扩增阴性对照）。

4. 分别在各管加入：

成分	样品管 N+3 个	PCR 阴性对照	SRB *dsrA* 基因 PC	SRB *dsrB* 基因 PC
2×Probe PCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
SRB *dsrA*/*dsrB* 基因双重 PCR 引物-探针混合液	各 4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
N+3 个待测 DNA 样本	各 6 μL	不加	不加	不加
超纯水	不加	6 μL	不加	不加
SRB *dsrA* 基因 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	6 μL	不加
SRB *dsrB* 基因 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	6 μL

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
	52℃	15 sec
	60℃	60 sec（采集 FAM 通道和 Hex 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

四、数据处理

6. 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。

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，则阴性对照 FAM 通道的 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照 FAM 通道的荧光信号必须有对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于或等于 40。对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 大于或等于 40 则为 SRB *dsrA* 基因阴性，如果小于或等于 40 则为 SRB *dsrA* 基因阳性。如果其 HEX 通道的 Ct 大于或等于 40 则为 SRB *dsrB* 基因阴性，如果小于或等于 40 则为 SRB *dsrB* 基因阳性。

关联产品	硫酸盐还原菌可视化染料-荧光染料恒温扩增试剂盒

20260918qjy