天净沙系列

CAT#:15-14830-ctxA-ctxB

低温运输，-20℃保存

天净沙

霍乱弧菌 *ctxA*/*ctxB* 基因双重探针法 PCR 试剂盒

Vibrio cholerae *ctxA*/*ctxB* Gene Duplex Probe PCR Kit

使用手册 V0.53

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与分型霍乱弧菌 *ctxA* 基因和 *ctxB* 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，引物是根据霍乱弧菌 *ctxA* 基因和 *ctxB* 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. 霍乱弧菌 *ctxA* 基因和霍乱弧菌 *ctxB* 基因分别用 FAM 和 Cy5 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 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
霍乱弧菌 *ctxA*/*ctxB* 基因 PCR 引物-探针干粉	yp15-14830-ctxA-ctxB	50 次	1.5 mL 棕色管
霍乱弧菌 *ctxA* 基因阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc15-14830-ctxA	50 μL	0.5 mL 黄盖管
霍乱弧菌 *ctxB* 基因阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc15-14830-ctxB	50 μL	0.5 mL 白盖管
使用手册	sc15-14830-ctxA-ctxB	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，超纯水。

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，多出的两个分别是霍乱弧菌 *ctxA* 基因和霍乱弧菌 *ctxB* 基因的 PPC（样品制备阳性对照），另一个是 PNC（样品制备阴性对照）。可以用自备的、确定是阳性的样本作为 PPC，可以用自备的、确定是阴性的样本作为 PNC。如没有，可以用 10 μL 本产品提供的霍乱弧菌 *ctxA* 基因阳性对照（1E4 拷贝/μL）和霍乱弧菌 *ctxB* 基因阳性对照（1E4 拷贝/μL）再加上一定量的水，使总体积跟样本制备试剂盒所要求的起始样本体积一样，以此分别作为两个 PC，另外用水作为 NC，

水的总体积需要跟样本制备试剂盒所要求的样本体积一样。

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. 首次使用本试剂盒时，将 PCR 引物-探针干粉管短暂离心，然后在离心管中加入 220 μL 的超纯水，涡旋混匀 30 秒后得 PCR 引物-探针混合液，放冰上待用。未用完的需要-20℃保存。

4. 如果只做 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，另外两个分别用于霍乱弧菌 *ctxA* 基因和霍乱弧菌 *ctxB* 基因扩增阳性对照（APC），1 个用于扩增阴性对照（ANC，用水做模板）。

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	N+3 个样品管	ANC 管	*ctxA* 基因 APC 管	*ctxB* 基因 APC 管
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
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
霍乱弧菌 *ctxA* 基因阳性对照（1E4 拷贝/μL）	不加	不加	6 μL	不加
霍乱弧菌 *ctxB* 基因阳性对照（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℃	10 min
PCR 反应（45 个循环）	95℃	15 sec
	52℃	15 sec
	60℃	60 sec（采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

三、数据处理

7. 根据以下表格，判断所有对照反应结果的阳性或阴性:

信号通道	判断标准	结果
FAM	Ct 值小于 40 且扩增曲线呈倒 S 型	FAM 阳性
	Ct 值大于等于 40	FAM 阴性

	无 Ct 值	FAM 阴性
Cy5	Ct 值小于 40 且扩增曲线呈倒 S 型	Cy5 阳性
	Ct 值大于等于 40	Cy5 阴性
	无 Ct 值	Cy5 阴性

1. 制备实验有效性确定：若两个 PPC 分别为 FAM 及 Cy5 阳性且 PNC 为 FAM 和 Cy5 阴性，则 DNA 制备实验有效，可继续后续分析。若霍乱弧菌 *ctxA* 基因 PPC 为 FAM 阴性或霍乱弧菌 *ctxB* 基因 PPC 为 Cy5 阴性，则整个 DNA 制备实验无效，无需进行后续分析，必须重复 DNA 制备实验。导致纯化失效的可能原因包括：DNA 制备试剂盒失效、制备实验操作失误、PCR 仪器故障，或 PNC 样本受到既往实验残留污染或其他阳性样本交叉污染。
2. 扩增实验有效性判断：若霍乱弧菌 *ctxA* 基因 APC 为 FAM 阳性，霍乱弧菌 *ctxB* 基因 APC 为 Cy5 阳性，且 ANC 为 FAM 和 Cy5 阴性，则 PCR 扩增实验有效，可继续后续分析。若霍乱弧菌 *ctxA* 基因 APC 为 FAM 阴性，或霍乱弧菌 *ctxB* 基因 APC 为 Cy5 阴性，或 ANC 为 FAM 或 Cy5 阳性，则整个 PCR 扩增实验无效，无需进行后续分析，必须查明扩增失败原因。可能原因包括：PCR 试剂失效、PCR 仪器故障、ANC 样本受到既往实验残留污染或其他阳性样本交叉污染。
3. 若制备与扩增实验均有效，则进行样本结果分析。如果某待测样品 FAM Ct 大于或等于 40，则为霍乱弧菌 *ctxA* 基因阴性；如果小于 40 则为霍乱弧菌 *ctxA* 基因阳性。如果某待测样本的 Cy5 Ct 大于或等于 40，则为霍乱弧菌 *ctxB* 基因阴性；如果小于 40 则为霍乱弧菌 *ctxB* 基因阳性。

关联产品	霍乱弧菌可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒