天净沙系列

CAT#:15-34510-N

低温运输，-20℃保存

天净沙

肉毒梭状芽孢杆菌及肉毒毒素基因多重实时荧光 PCR 检测试剂盒

Clostridium botulinum and *botulinum* Toxin Genes Multiplex Real-Time Fluorescent 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

本产品是针对梭菌属、肉毒梭菌、丁酸梭菌及 4 种肉毒毒素基因 A、B、E、F 开发的肉毒梭状芽孢杆菌及肉毒毒素基因多重 PCR 检测试剂盒，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，引物根据肉毒梭状芽孢杆菌及肉毒毒素基因多重的 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。
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
梭菌属、肉毒梭菌、丁酸梭菌探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉	yp15-34510-N pt1	50 次	0.5 mL 棕色盖
肉毒毒素基因 A、B、E、F 探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉	yp15-34510-N pt2	50 次	0.5 mL 棕色盖
梭菌属 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	Pc34500	50 μL	0.5 mL 黄色盖
肉毒梭菌 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	Pc34510	50 μL	0.5 mL 黄色盖
丁酸梭菌 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	Pc34515	50 μL	0.5 mL 黄色盖
肉毒毒素基因 A 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	Pc34510-A	50 μL	0.5 mL 黄色盖
肉毒毒素基因 B 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	Pc34510-B	50 μL	0.5 mL 黄色盖
肉毒毒素基因 E 阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	Pc34510-E	50 μL	0.5 mL 黄色盖
肉毒毒素基因 F 阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	Pc34510-F	50 μL	0.5 mL 黄色盖
使用手册	15-34510-Nsc	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 7 个是已知为梭菌属、肉毒梭菌、丁酸梭菌及 4 种肉毒毒素基因 A、B、E、F 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梭菌属、肉毒梭菌、丁酸梭菌的 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	梭菌属 APC	肉毒梭菌 APC	丁酸梭菌 APC
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
梭菌属、肉毒梭菌、丁酸梭菌探针法 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
梭菌属 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	1.6 μL	不加	不加
肉毒梭菌 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	1.6 μL	不加
丁酸梭菌 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	不加	1.6 μL

四、设置四重 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）+ 5 个 PCR 管，多出的 5 个中 4 个用于肉毒毒素基因 A、B、E、F 的 APC，一个用于 ANC。分别在各管加入：

成分	样品管 N+6 个	ANC	基因 A APC	基因 B APC	基因 E APC	基因 F APC
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
肉毒毒素基因 A、B、E、F 探针法 qPCR 引物-探针混合	各 5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL

液干粉						
N+2 个待测 DNA 样本	各 2.5 μL	不加	不加	不加	不加	不加
超纯水	各 2.5 μL	5 μL	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
肉毒毒素基因 A 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	2.5 μL	不加	不加	不加
肉毒毒素基因 B 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	2.5 μL	不加	不加
肉毒毒素基因 E 阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	不加	2.5 μL	不加
肉毒毒素基因 F 阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	不加	不加	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) 对四重 PCR，设置 60 sec（采集 FAM、VIC、Cy5、HEX 个通道的荧光信号）

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。

三重结果判定		
FAM	Ct 值小于或等于 44	梭菌属基因阳性
	Ct 值大于 44	梭菌属基因阴性

VIC	Ct 值小于或等于 35	肉毒梭菌基因阳性
	Ct 值大于 35	肉毒梭菌基因阴性
ROX	Ct 值小于或等于 45	丁酸梭菌基因阳性
	Ct 值大于 45	丁酸梭菌基因阴性

四重结果判定		
FAM	Ct 值小于或等于 38	基因 A 阳性
	Ct 值大于 38	基因 A 阴性
VIC	Ct 值小于或等于 38	基因 B 阳性
	Ct 值大于 38	基因 B 阴性
Cy5	Ct 值小于或等于 38	基因 E 阳性
	Ct 值大于 38	基因 E 阴性
HEX	Ct 值小于或等于 38	基因 F 阳性
	Ct 值大于 38	基因 F 阴性

关联产品	梭状芽孢杆菌属通用探针法 qPCR 试剂盒（不含内参）