

上海通尉

TW—reagent.com 上海通尉

# 蜡状芽孢杆菌探针法 qPCR 试剂盒

Bacillus cereus Probe PCR Kit

仅

供

科

研

使

用

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>蜡样芽孢杆菌 (Bacillus cereus) ， 又称仙人掌杆菌， 是一种革兰氏阳性菌， <math>\beta</math>溶血性的杆状细菌。传统食品大多以自然发酵为主， 在长期发酵过程中引入了环境中的多种病原微生物， 蜡样芽孢杆菌作为一种食源性条件致病菌， 通过产生腹泻型或者呕吐型毒素影响人体健康， 因此蜡状芽孢杆菌的快速检测具有重要意义。为此本公司以探针法 qPCR 技术为基础开发了蜡状芽孢杆菌的检测试剂盒， <b>它具有下列特点：</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 即开即用， 用户只需要提供样品 DNA 模板。</li> <li>2. 引物和探针经过优化， 灵敏度高， 检测限可达 100 拷贝/反应。</li> <li>3. 提供阳性对照， 便于区分假阴性样品。</li> <li>4. 特异性高， 引物是根据蜡状芽孢杆菌基因组 DNA 高度保守区设计， 不会跟其它生物的 DNA 发生交叉反应。</li> <li>5. 既可用于定性检测， 又可用于定量检测。用于定量检测时， 线性范围至少 5 个数量级。</li> <li>6. 本产品足够 50 次 20 <math>\mu</math>L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。</li> <li>7. 本产品只能用于科研。</li> </ol>																							
<p><b>规格及成分</b></p>	<table border="1" data-bbox="354 1136 1536 1539"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>规格</th> <th>包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×Probe qPCR MasterMix</td> <td>500<math>\mu</math>L</td> <td>0.5mL 本色盖</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>1mL</td> <td>1.5mL 绿盖管</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>1mL</td> <td>1.5mL 蓝盖管</td> </tr> <tr> <td>蜡状芽孢杆菌 qPCR 引物-探针干粉</td> <td>50 次</td> <td>0.5mL 棕色管</td> </tr> <tr> <td>蜡状芽孢杆菌阳性对照(1E7 拷贝/<math>\mu</math>L)</td> <td>50<math>\mu</math>L</td> <td>0.5mL 黄盖管</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">本产品采用五孔盒包装</p> <p><b>注意：</b>引物-探针干粉在使用前需要离心， 然后在离心管中加入 165<math>\mu</math>L 的超纯水充分混匀后再使用， 未用完的需要-20<math>^{\circ}</math>C 保存。</p>			成分	规格	包装	2×Probe qPCR MasterMix	500 $\mu$ L	0.5mL 本色盖	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管	超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管	蜡状芽孢杆菌 qPCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 棕色管	蜡状芽孢杆菌阳性对照(1E7 拷贝/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L	0.5mL 黄盖管	使用手册	1 份	无
成分	规格	包装																						
2×Probe qPCR MasterMix	500 $\mu$ L	0.5mL 本色盖																						
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管																						
超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管																						
蜡状芽孢杆菌 qPCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 棕色管																						
蜡状芽孢杆菌阳性对照(1E7 拷贝/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L	0.5mL 黄盖管																						
使用手册	1 份	无																						
<p><b>使用方法</b></p>	<p><b>一、稀释标准曲线样品</b> (以 1E1-1E6 拷贝/<math>\mu</math>L 这 6 个 10 倍稀释度为例)。由于标准品浓度非常高， 因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行， 千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分。本产品不提供活体样品做阳性对照， 只提供 DNA 片段作为阳性对照。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 标记 6 个离心管， 分别为 6， 5， 4， 3， 2， 1。</li> </ol>																							

2. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu\text{L}$  荧光 PCR 专用模板稀释液, 用带芯枪头 (下同)。
3. 在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E7 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡混匀 1 分钟, 得到 1E6 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E6 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡混匀 1 分钟, 得到 1E5 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 4 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E5 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步所得), 充分震荡混匀 1 分钟, 得到 1E4 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 依次重复上面的操作得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

## **二、样品 DNA 的制备**

7. 如果有 N 个样品, 设置 N+2 个提取, 多出的一个是 PC (样品制备阳性对照), 一个是 NC (样品制备阴性对照)。可以用 10  $\mu\text{L}$  上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样, 以此作为 PC。另外用水作为 NC。
8. 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。

## **三、Probe qPCR 反应 (20 $\mu\text{L}$ 体系, 在样品制备室进行)**

9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+9 个 PCR 管, 其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品, 1 个用于 PCR 阴性对照 (用水做模板), 6 个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+4 个 PCR 管, 其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品, 1 个用于 PCR 阴性对照 (用水做模板), 1 个用于 PCR 阳性对照 (直接用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板)。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
10. 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加) :

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
----	--------------	-------------	--------------------

2×Probe qPCR MasterMix	各 10μL	10μL	各 10μL
蜡状芽孢杆菌 qPCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL
待测样本 DNA 模板	各 7μL	不加	不加
超纯水	不加	7μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7μL

11. 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℃	10min
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15sec
	60℃	1min (采集 FAM 通道, 淬灭基团为 TAMRA)

#### 四、数据处理

12. 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。

13. 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。

14. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。

15. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于 40，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 40，则为阴性。如果 Ct 小于 40 则为阳性。

PCR 编号	TW-E11157
说明书	1 份

<b>自备试剂</b>	超纯水, 样品 DNA
<b>运输及保存</b>	低温运输, -20°C保存, 有效期 2 年

**生产企业: 上海通蔚实业有限公司**

**公司地址: 上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603**

**公司电话: 021-54845833**

**技术支持: 15800441009**