

分枝杆菌属通用探针法荧光定量 PCR 试剂盒

Mycobacterium spp. Probe qPCR Kit

CAT#:BN63772

低温运输, -20℃保存

产品及特点

分枝杆菌属 (*Mycobacterium spp.*) 是一类细长略弯曲的, 有时有分枝或出现丝状体的细菌。本属细菌的主要特点是细胞壁含有大量脂质, 主要是分枝菌酸。这和其染色性、生长特性、致病性、抵抗力等密切相关。一般不易着色, 若经加温或延长染色时间而着色后能抵抗强脱色剂盐酸乙醇的脱色, 故又称抗酸杆菌。该菌属无鞭毛、无芽胞、不产生内、外毒素, 其致病性和菌体成分有关。引起的疾病都呈慢性, 并伴有肉芽肿。分枝杆菌种类较多, 对人致病的主要有结核分枝杆菌和麻风分枝杆菌。本产品就是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测分枝杆菌属的试剂盒, 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, 灵敏性较高。具体的检测灵敏度跟不同的分枝杆菌种相关, 一般在 1000 拷贝/uL 左右。
3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。
4. 特异性高, 引物是根据分枝杆菌属细菌 DNA 的高度保守区设计。
5. 涵盖广, in silico 分析发现其可以检测 *M.tuberculosis*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. porcinum* 和 *M. immunogenum* 等分枝杆菌, 不会跟其他非分枝杆菌属细菌发生交叉反应。
6. 本产品既可用于定性检测, 也可以用于定量检测, 用于定量检测时线性范围至少有 5 个数量级。
7. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

成分	成分	编号	五孔盒包装
	2×Probe qPCR MasterMix	60001	500μL
	荧光 PCR 专用模板稀释液	60002	1mL
	超纯水	60003	1mL
	分枝杆菌通用探针法 qPCR 引物-探针混合液	63772-4	150μL
	分枝杆菌通用 PCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/μL)	63772-5	50μL
	使用手册		1 份
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、稀释标准曲线样品（以 10E1-10E6 拷贝/μL 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）。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供无传染性的 DNA 片段作为阳性对照。 1. 标记 6 个离心管，分别为 6，5，4，3，2，1。 2. 用带芯枪头分别加入 45μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。 3. 在 6 号管中加入 5μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。 4. 换枪头，在 5 号管中加入 5μL 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。 5. 换枪头，在 4 号管中加入 5μL 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E4 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。 6. 重复上面的操作直到得到 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，最好设置 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 10μL 第 4 号稀释液（第 6 步所得）再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为样本制备 PC。另外用水作为样本制备 NC。		

8. 用自选方法纯化样品的 DNA, 本扩增试剂盒跟市场上大多数细菌 DNA 提取试剂盒兼容。也可以使用本公司的免提取的核酸释放剂。

三、Probe qPCR 反应 (20 μ 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 (可直接用第 6 步所得的第 4 号稀释液)。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最后加) :

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性 对照管	标准曲线样品管 (1-6 管)
2 $\times$ Probe qPCR MagicMix	10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
分枝杆菌通用探针法 qPCR 引物-探针混合液	3 μ L	3 μ L	各 3 μ L
N+2 个待测 DNA 模板	7 μ L	不加	不加
超纯水	不加	7 μ L	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀 释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7 μ L (1 号样到 1 号管, 2 号样到 2 号 管...)

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 $^{\circ}$ C	3 min
PCR 反应 (40 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15 sec
	60 $^{\circ}$ C	60sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 淬灭基团为 BHQ3)

五、数据处理

12. 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。 13. 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 Ct 必须为零等于 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 35。对待测样品，如果其 Ct 为零或等于 40 则为阴性，如果小于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。重复实验的 Ct 值如果等于 40 则为阴性，如果小于 40，则为阳性。
关联产品	分枝杆菌属通用可视化 LAMP 检测试剂盒