

# 放线菌属通用探针法qPCR试剂盒（不含内参）

## *Actinomyces spp.* Probe PCR Kit

货号：BN61045

低温运输，-20℃保存

### 产品及特点

放线菌属 (*Actinomyces spp.*) 为原核细胞型微生物，革兰染色阳性，非抗酸性丝状菌，菌丝细长无分隔，有分枝。放线菌广泛分布于自然界，种类繁多，为人体的正常菌群成员，可引起内源性感染。对人致病的主要有衣氏放线菌，牛放线菌可使牛和猪患病。放线菌大多寄居于人和动物口腔、上呼吸道、消化道及泌尿生殖道，属正常菌群。当机体抵抗力降低、口腔卫生不良、拔牙或口腔黏膜受损时，可致内源性感染，引起放线菌病。放线菌病是一种软组织的化脓性炎症，若无继发感染，多呈慢性肉芽肿，好发于面颈部，也可进入胃肠道和肺部，引起相应感染。放线菌属的流行给人类的生活带来很大的困扰，因此快速检测放线菌属具有重要意义。本产品是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测放线菌属的试剂盒，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，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，引物是根据放线菌属DNA高度保守区设计，不会跟其他病毒的DNA发生交叉反应。
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为5个数量级。
6. 本产品足够50次20μL体系的探针法荧光定量PCR反应。
7. 本产品只能用于科研。

### 规格及成分

本产品使用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR Master Mix	60001	500 μL	0.5mL
荧光PCR专用模板稀释液	60002	1 mL	1.5mL
超纯水	60003	1 mL	1.5mL

本产品仅用于科研

	放线菌属qPCR引物-探针干粉	61045-4	50 次	0.5mL
	放线菌属qPCR阳性对照(1×10E7拷贝/μL)	61045-5	50 μL	0.5mL
	使用手册	61045-6	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165μL的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。			
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20℃保存，保存期限为24个月。			
<b>自备物品</b>	超纯水，样品DNA。			
<b>使用方法</b>	<p><b>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）。</b>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。</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> <li>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）。</li> <li>3. 在6号管中加入5μL1×10E7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。</li> <li>4. 换枪头，在5号管中加入5μL1×10E6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。</li> <li>5. 换枪头，在4号管中加入5μL1×10E5拷贝/μL的阳性对照(上步所得)，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。</li> <li>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。</li> </ol> <p><b>二、样品DNA的制备</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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上步所得4号稀释液再加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。</li> <li>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。</li> </ol> <p><b>三、Probe qPCR 反应（20μL体系，在样品制备室进行）</b></p>			

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+3个	RT-PCR 阴性对照	标曲样品管 (1-6)
2×Probe qPCR Magic Mix	各10 μL	10 μL	各10 μL
放线菌属qPCR引物-探针 混合液	各3 μL	3 μL	各3 μL
待测样本DNA模板	7 μL	不加	不加
超纯水	不加	7 μL	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（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℃	5 min
PCR反应 (45个循环)	95℃	15 sec
	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。