

嗜黏蛋白阿克曼菌探针法 qPCR 试剂盒 (不含内参)

Akkermansia muciniphila Probe PCR Kit

货号: BN66009

低温运输, -20℃保存, 保存期限为 24 个月。

产品及特点

嗜黏蛋白阿克曼菌 (*Akkermansia muciniphila*) 是一种粘蛋白分解细菌, 为卵圆形, 革兰阴性的厌氧菌, 该细菌栖息在人类和许多其他动物的肠道中。嗜黏蛋白阿克曼菌与肥胖、糖尿病、心血管疾病和低度炎症呈负相关。口服嗜黏蛋白阿克曼菌可改善小鼠代谢疾病的相关症状, 并有望成为治疗 2 型糖尿病和肥胖的候选药物。因此嗜黏蛋白阿克曼菌的快速检测具有重要意义。为此本公司以探针法 qPCR 技术为基础开发了嗜黏蛋白阿克曼菌的检测试剂盒, 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, 灵敏度高, 最低检测限可达 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, 引物是根据嗜黏蛋白阿克曼菌基因组 DNA 高度保守区设计, 不会跟其它生物的 DNA 发生交叉反应。
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。
6. 本产品足够 50 次 20 μL 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
2 × Probe qPCR MasterMix	60001	500 μL
荧光 PCR 专用模板稀释液	60002	1 mL
超纯水	60003	1 mL
嗜黏蛋白阿克曼菌 qPCR 引物-探针干粉	66009-4	50 次
嗜黏蛋白阿克曼菌阳性对照 (1E7 拷贝/μL)	66009-5	50 μL

注意: 引物-探针干粉在使用前需要离心, 然后在离心管中加入 165 μL 的超纯水充分混匀后再使用, 未用完的需要 -20℃ 保存。

本产品仅用于科研

自备试剂	超纯水, 样品 DNA。
使用方法	<p>一、稀释标准曲线样品 (以 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例)。</p> <p>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">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 45 μL 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 5 μL 1E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡混匀 1 分钟, 得到 1E6 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 5 μL 1E6 拷贝/μL 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/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。5. 换枪头, 在 4 号管中加入 5 μL 1E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步所得), 充分震荡混匀 1 分钟, 得到 1E4 拷贝/μL 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。 <p>二、样品 DNA 的制备</p> <ol style="list-style-type: none">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 10 μL 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。 <p>三、qPCR 反应 (20 μL 体系, 在样品制备室进行)</p> <ol style="list-style-type: none">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最后加）：

成分	样品管 N+3 个	PCR 阴性 对照管	标曲样品管 (1-6)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
嗜黏蛋白阿克曼菌 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 7 μL (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，如果没有 Ct 或 Ct 大于或等于 40，则为阴性。如果 Ct 小于 40 则为阳性。
关联产品	蜡状芽孢杆菌可视化-荧光染料 LAMP 试剂盒