

地衣形芽孢杆菌探针法qPCR试剂盒

Bacillus licheniformis Probe PCR Kit

CAT#:BN61291

低温运输, -20℃保存

产品及特点

地衣形芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)是一种在土壤中常见的革兰氏阳性嗜热细菌,可调整菌群失调达到治疗目的,可促使机体产生抗菌活性物质、杀灭致病菌。它能产生抗活性物质,并具有独特的生物夺氧作用机制,能抑制致病菌的生长繁殖。因此快速检测地衣形芽孢杆菌具有重要意义。荧光定量PCR是检测传染病的主流技术,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地衣形芽孢杆菌的试剂盒,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,灵敏度高,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,引物是根据地衣形芽孢杆菌DNA高度保守区设计,不会跟其他生物的DNA发生交叉反应。
5. 既用于定性检测,又用于定量检测。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

成分	编号	规格
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL
荧光PCR专用模板稀释液	180701	1 mL
超纯水	210806	1 mL
地衣形芽孢杆菌qPCR 引物-探针干粉	yp15-25470sf	50 次
地衣形芽孢杆菌PCR阳性 对照(1E7拷贝/μL)	pc25470- DQ309295	50 μL

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165 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、稀释标准曲线样品（以1E1-1E6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1分钟，得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1分钟，得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(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1E4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10 μL 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。 三、Probe qPCR反应（20 μL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×Probe qPCR MasterMix	10 μL	10 μL	各10 μL
地衣形芽孢杆菌qPCR 引物-探针混合液	3 μL	3 μL	各3 μL
N+2个待测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℃	10 min
PCR反应 (40个循环)	95℃	15 sec
	60℃	60 sec（采集FAM通道的荧光信号，设置TAMRA为淬灭基团）

注：部分（如：伯乐CFX96）机型如果两步法效果不理想可采用三步法：95℃ 10分钟，（94℃ 15秒、60℃ 15秒、72℃ 30秒）循环35-45次，每个循环第三步采集荧光信号。

四、数据处理

12. 如果样本制备阳性对照或PCR阳性对照(包括标曲样本)结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据，需要重新样本制备，重新进行PCR扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或PCR阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系。
13. 如果阴性对照和阳性对照均正常，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。
-