

芽孢杆菌通用探针法qPCR试剂盒（不含内参）

Bacillus spp. Probe qPCR Kit

CAT#:BN61299

低温运输，-20℃保存

产品及特点

芽孢杆菌 (*Bacillus*) 属于芽孢杆菌科芽孢杆菌属，为革兰氏阳性菌。细胞呈直杆状，常以成对或链状排列，具圆端或方端。芽孢杆菌对外界有害因子抵抗力强、分布广，存在于土壤、水、空气以及动物肠道等处，在工农业及医药生产中均有广泛应用，因此快速检测芽孢杆菌具有重要意义。为此本公司以探针法 qPCR 技术为基础开发了芽孢杆菌的检测试剂盒，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，引物是根据芽孢杆菌基因组DNA高度保守区设计，可以检测本属的主要物种，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	0.5 mL
荧光PCR专用模板稀释液	60002	1 mL
超纯水	60003	1 mL
芽孢杆菌通用 qPCR 引物-探针干粉	61299-4	50 次
芽孢杆菌通用阳性对照 (1E7 拷贝/μL)	61299-5	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。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为24个月。

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

自备物品	超纯水，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。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。 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。 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。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、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（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	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
芽孢杆菌通用 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℃	1 min (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。