

结核分枝杆菌探针法qPCR试剂盒

Mycobacterium tuberculosis Probe PCR Kit

CAT#:BN63775

低温运输, -20℃保存

产品及特点

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB), 俗称结核杆菌, 是引起结核病的病原菌, 可侵染全身各器官, 但以侵染肺为最多见。结核病至今仍是重要的传染病。因此快速检测结核分枝杆菌具有重要意义, 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结核分枝杆菌的试剂盒, 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, 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, 引物是根据结核分枝杆菌DNA高度保守区设计, 不会跟其他细菌的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20 μ L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 $\times$ Probe qPCR MasterMix	60001	500 μ L	0.5 mL
荧光PCR专用模板稀释液	60002	1 mL	1.5 mL
超纯水	60003	1 mL	1.5 mL
结核分枝杆菌qPCR 引物-探针干粉	63775-4	50次	0.5 mL
结核分枝杆菌qPCR阳性对照 (1E7拷贝/ μ L)	63775-5	50 μ L	0.5 mL

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 μ L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

自备试剂	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）。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。 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、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（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	RT-PCR 阴性对照	标曲样品管 (1-6)
2×Probe qPCR MagicMix	各10 μL	10 μL	各10 μL
结核分枝杆菌qPCR 引物-探针混合液	各3 μL	3 μL	各3 μL
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	95℃	15 sec
(45个循环)	60℃	1 min（采集FAM通道，淬灭基团为TAMRA）

四、数据处理

- 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。
- 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。
- 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，分别以阳性对照（FAM通道）和（HEX通道）的Ct值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照的标准曲线为斜线， r^2 必须大于0.95。再以待测样品的Ct值从阳性对照的标准曲线上推算出样品DNA浓度的log值，再推算出其浓度。
- 对定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照FAM通道的Ct必须大于或等于40。阳性对照FAM通道的荧光信号必须有对数增长，有典型扩增曲线，Ct值应该小于或等于35。对待测样品，如果其FAM通道的Ct大于或等于40则为结核分枝杆菌阴性，如果小于或等于35则为结核分枝杆菌阳性。如果在

	35-40之间，则重复一次。重复实验的Ct值如果大于或等于40则为阴性，如果小于40，则为阳性。
--	--