

非结核分枝杆菌探针法 qPCR 试剂盒（不含内参）

Nontuberculous mycobacteria Probe qPCR Kit

CAT#:BN63991

低温运输，-20℃保存

产品及特点

非结核分枝杆菌 (Nontuberculous mycobacteria, NTM) 是指结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 与麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*) 以外的分枝杆菌。非结核分枝杆菌是一种条件致病菌，广泛存在于水、土壤和气溶胶中。该类菌可致免疫力低下者广泛感染，轻者可至皮肤感染，重者会危及生命，给人类健康带来极大威胁。因此，快速检测非结核分枝杆菌具有重要的意义。为此，本公司以探针法 qPCR 技术为基础开发了非结核分枝杆菌的检测试剂盒，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 1000 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，引物是根据非结核分枝杆菌基因组 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 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

成分	编号	规格
2 $\times$ Probe qPCR MasterMix	60001	500 μ L
荧光 PCR 专用模板稀释液	60002	1 mL
超纯水	60003	1 mL
非结核分枝杆菌 qPCR 引物-探针干粉	63991-4	50 次
非结核分枝杆菌阳性对照 (1E7 拷贝/ μ L)	63991-5	50 μ L

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 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。
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。 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
非结核分枝杆菌 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 (40 个循环)	95℃	15 sec
	60℃	60 sec（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。
--	-------------------------------