

天
净
沙
系
列

CAT#:14-32300
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

乳酸杆菌荧光 PCR 检测试剂盒 (染料法)

Lactobacillus qPCR Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>乳酸杆菌 (<i>Lactobacillus</i>) 广泛存在于乳制品 (如乳酪、酸奶) 中。某些乳酸杆菌如嗜酸乳酸杆菌、保加利亚乳杆菌, 常用于饮料等发酵工业。也有些常用于生物检定, 如乳酪乳杆菌被广泛应用于各种维生素 B 和各种氨基酸的检定、李氏乳杆菌用于维生素 B12 的微生物学检定。而有一些乳酸菌, 特别是乳杆菌可以在含酒花物质的啤酒中生长, 是啤酒腐败的主要细菌。本试剂盒利用实时荧光定量 PCR 技术开发的乳酸杆菌检测试剂盒, 通过荧光染料实时显示样品模板 DNA 的量, 并通过坐标曲线表示出来, 结果直观准确。</p> <p>它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 根据乳酸杆菌 16S rDNA 序列的特征, 设计的针对乳酸杆菌的 PCR 引物, 克服了其他细菌的干扰。 2. 即开即用, 用户只需要提供样品模板, 操作简单, 定量准确快速。 3. 荧光定量 PCR 检测, 反应特异性强。 4. 本试剂盒足够 100 次 20uL 体系的 qPCR 反应。 5. 本产品只适用于科研, 不能用于临床诊断。 																							
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="545 1016 1428 1496"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装(无纸托)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×qPCR MagicMix</td> <td>90408</td> <td>1.0 mL (A 袋包装)</td> </tr> <tr> <td>乳酸杆菌专一性引物 A</td> <td>yw1470</td> <td>1 OD (A 袋包装)</td> </tr> <tr> <td>乳酸杆菌专一性引物 B</td> <td>yw1471</td> <td>1 OD (A 袋包装)</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>100935</td> <td>1 mL×2 (A 袋包装)</td> </tr> <tr> <td>乳酸杆菌阳性对照 (10E9copy/μL)</td> <td>yw14721473</td> <td>50 μL (B 袋包装)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>14-32300sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	十孔盒包装(无纸托)	2×qPCR MagicMix	90408	1.0 mL (A 袋包装)	乳酸杆菌专一性引物 A	yw1470	1 OD (A 袋包装)	乳酸杆菌专一性引物 B	yw1471	1 OD (A 袋包装)	超纯水	100935	1 mL×2 (A 袋包装)	乳酸杆菌阳性对照 (10E9copy/μL)	yw14721473	50 μL (B 袋包装)	使用手册	14-32300sc	1 份
成分	编号	十孔盒包装(无纸托)																						
2×qPCR MagicMix	90408	1.0 mL (A 袋包装)																						
乳酸杆菌专一性引物 A	yw1470	1 OD (A 袋包装)																						
乳酸杆菌专一性引物 B	yw1471	1 OD (A 袋包装)																						
超纯水	100935	1 mL×2 (A 袋包装)																						
乳酸杆菌阳性对照 (10E9copy/μL)	yw14721473	50 μL (B 袋包装)																						
使用手册	14-32300sc	1 份																						
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输、-20℃保存(B 袋的阳性对照一定要放扩增区, A 袋放样品准备区), 有效期一年。</p>																							
<p>自备试剂</p>	<p>DNA 模板。</p>																							
<p>使用方法</p>	<p>一、样品 DNA 的制备</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 用自选方法纯化乳酸杆菌样品的 DNA, 也可以另购本公司的细菌 DNAout, 此产品跟本试剂盒兼容。 <p>二、引物的制备 (在样品制备室进行)</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. 按引物标签提示在装引物干粉的管中直接加入适量的超纯水 (加入量见引物试管上的标签), 使得两条引物的浓度均为 10 uM (10pmol/uL)。 <p>三、稀释阳性对照 (以 10-10E6 这 6 个 10 倍稀释度为例。由于标准品浓度非常</p>																							

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，本产品不提供活体菌做阳性对照，只提供可以直接使用的长度为 341bp 的 DNA 片段作为阳性对照。

3. 标记 6 个离心管，分别为 6, 5, 4, 3, 2 和 1 号。
4. 用带芯枪头分别加入 45 μL 超纯水 (最好用带芯枪头，下同)。
5. 先将本试剂盒提供的乳酸杆菌阳性对照用超纯水 10 倍梯度稀释到 $10\text{E}7$ 拷贝/ μL (注: 请不要将本试剂盒提供的标准品一次性稀释至 $10\text{E}7$ 拷贝/ μL ，建议每次稀释 10 倍，梯度稀释至 $10\text{E}7$ 拷贝/ μL)。放冰上待用。
6. 在 6 号管中加入 5 μL $10\text{E}7$ 拷贝/ μL 的乳酸杆菌阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $10\text{E}6$ 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
7. 换枪头，从 6 号管中取 5 μL 溶液到 5 号管中，充分震荡 1 分钟，得 $10\text{E}5$ 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
8. 换枪头，从 5 号管中取 5 μL 溶液到 4 号管中，重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。

三、设置 PCR 反应 (20 μL 体系，在样品制备室进行)

9. 在 PCR 管中加入下列成分 (待测样品需要做三次重复，下表只列出一。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成分盖上盖子储存好后最后加)：

成分	样品	阴性对照	阳性对照(1-6 管)
2 \times qPCR Mix	10 μL	10 μL	各 10 μL
乳酸杆菌专一性引物 A, 10 μM	1 μL	1 μL	各 1 μL
乳酸杆菌专一性引物 B, 10 μM	1 μL	1 μL	各 1 μL
自备 10 \times ROX (见注)	2 μL	2 μL	各 2 μL
待测样品 DNA 模板	1-5 μL	不加	不加
阳性对照 (1-6 号)	不加	不加	各 5 μL (1 号样到 1 号管, 2 号样到 2 号管...)
补水到	20 μL	20 μL	20 μL

注:仅 ABI7500、7700 和 7900 仪器需要使用 ROX 作为对照,其他荧光 PCR 仪器 (如 iCycler IQ、MJ Option、MJ Chromo4、MX3000、MX4000、RotorGene 3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480)不需要使用 ROX。

10. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR (具体 PCR 参数可以根据仪器不同而自行优化)。

过程	温度	时间
预变性	94℃	3 分钟
PCR 反应 (35 个循环)	94℃	30 秒
	58℃	30 秒
	72℃	1 分钟
复性	72℃	5 分钟

11. 数据采集

具体操作按所用仪器推荐的流程进行。本产品中所含的荧光染料在不结合 DNA 时,最大吸收光谱在 471 nm,结合 DNA 时的最大吸收光谱在 500 nm,最大发射光谱在 530 nm。

四、数据处理

12. 以乳酸杆菌 16S rDNA 序列阳性对照浓度的 log 值为横轴,以 Ct 值为纵轴,绘制标准曲线。再以待测样品浓度的 log 为横轴,以 Ct 值为纵轴,通过待测样品的 Ct 值计算出样品 DNA 的浓度。

关联产品

即用型荧光定量 PCR 试剂盒 (CAT#:90408-1)