

天
净
沙
系
列

CAT#:14-33900
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

双歧杆菌荧光 PCR 检测试剂盒 (染料法)

Bifidobacterium 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>双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium</i>) 是一类存在于人体中非常重要的专性厌氧菌, 于 1899 年首先在母乳喂养的健康婴儿粪便中发现并分离, 研究证实双歧杆菌具有平衡肠道菌群、降胆固醇、延缓衰老及抗肿瘤等生理功能, 是人体益生菌群的主要组成。添加双歧杆菌的微生态制剂开发研究已成为一大热点, 广泛应用于食品、保健和医疗等领域。但不断有报道指出国内外市场上双歧杆菌微生态制剂标示名称混乱, 很多国家市场上双歧杆菌制品假冒代替现象严重。针对该现象, 开发了针对双歧杆菌特异性检测试剂盒, 本产品利用实时荧光定量 PCR 技术, 通过荧光染料实时显示样品双歧杆菌模板 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. 根据双歧杆菌属 tuf 基因, 设计的针对双歧杆菌的 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. 本试剂盒可以进行 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="515 1084 1398 1559"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2 × qPCR Mix</td> <td>90408</td> <td>1.0 mL (A 袋包装)</td> </tr> <tr> <td>Tuf 基因专一性引物 A</td> <td>yw1466</td> <td>1 OD (A 袋包装)</td> </tr> <tr> <td>Tuf 基因专一性引物 B</td> <td>yw1467</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>Tuf 基因阳性对照 (10E9 copy/μL)</td> <td>yw14681469</td> <td>50 μL (B 袋包装)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>14-33900sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	十孔盒包装	2 × qPCR Mix	90408	1.0 mL (A 袋包装)	Tuf 基因专一性引物 A	yw1466	1 OD (A 袋包装)	Tuf 基因专一性引物 B	yw1467	1 OD (A 袋包装)	超纯水	100935	1 mL × 2 (A 袋包装)	Tuf 基因阳性对照 (10E9 copy/μL)	yw14681469	50 μL (B 袋包装)	使用手册	14-33900sc	1 份
成分	编号	十孔盒包装																						
2 × qPCR Mix	90408	1.0 mL (A 袋包装)																						
Tuf 基因专一性引物 A	yw1466	1 OD (A 袋包装)																						
Tuf 基因专一性引物 B	yw1467	1 OD (A 袋包装)																						
超纯水	100935	1 mL × 2 (A 袋包装)																						
Tuf 基因阳性对照 (10E9 copy/μL)	yw14681469	50 μL (B 袋包装)																						
使用手册	14-33900sc	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 袋的试剂放样品准备区), 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. 用自选方法纯化双歧杆菌样品的 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)。 																							

三、稀释阳性对照 (以 10E3-10E7 这 5 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,本产品不提供活体菌做阳性对照,只提供可以直接使用的长为 339bp 的 DNA 片段作为阳性对照。

3. 标记 5 个离心管,分别为 7, 6, 5, 4, 3 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双歧杆菌 Tuf 基因阳性对照用超纯水 10 倍梯度稀释到 10E8 拷贝/ μL 。放冰上待用。
6. 在 7 号管中加入 5 μL 10E8 拷贝/ μL 的双歧杆菌 Tuf 基因阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 10E7 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
7. 换枪头,在 6 号管中加入 5 μL 10E7 拷贝/ μL 的双歧杆菌 Tuf 基因阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 10E6 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
8. 换枪头,在 5 号管中加入 5 μL 10E6 拷贝/ μL 的双歧杆菌 Tuf 基因阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 10E5 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
9. 换枪头,在 4 号管中加入 5 μL 10E5 拷贝/ μL 的双歧杆菌 Tuf 基因阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 10E4 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。
10. 换枪头,在 3 号管中加入 5 μL 10E4 拷贝/ μL 的双歧杆菌 Tuf 基因阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 10E3 拷贝/ μL 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)

11. 在 PCR 管中加入下列成分(待测样品需要做三次重复,下表只列出一次。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
Tuf 基因专一性引物 A, 10 μM	1 μL	1 μL	各 1 μL
Tuf 基因专一性引物 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 号到 1 号,2 号到 2 号...)
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。

12. 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	95℃	5 分钟
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	10 秒
	58℃	45 秒
	72℃	1 分钟
复性	72℃	5 分钟

13. 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

14. 以 Tuf 基因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

PCR 抑制物清除剂(CAT#:60804), 即用型荧光定量 PCR 试剂盒 (CAT#:90408-1)