

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:14-90700  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

嗜麦芽窄食单胞菌染料法荧光定量 PCR 试剂盒  
*Stenotrophomonas maltophilia* SYBR 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](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>嗜麦芽窄食单胞菌(<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)广泛存在于水, 土壤, 动物体内, 为条件致病菌, 随着临床抗生素和免疫抑制的广泛和大剂量应用, 其分离率在非发酵菌属中呈上升趋势, 因该菌对多种抗生素耐药, 因而给临床治疗带来很大困难, 对人体健康造成严重损害, 因此快速检测嗜麦芽窄食单胞菌具有重要意义。荧光定量 PCR 是检测传染性疾病的主流技术, 本产品就是以染料法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测嗜麦芽窄食单胞菌的试剂盒, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 即开即用, 用户只需要提供 DNA 模板。</li> <li>2. 特异性高, 引物是根据人嗜麦芽窄食单胞菌高度保守区设计, 不会扩增其他细菌和微生物。</li> <li>3. 引物和扩增体系经过优化, 灵敏性比常规 PCR 高 100 倍。</li> <li>4. 提供无传染性的 PCR 阳性对照, 便于区分假阴性样品。</li> <li>5. 一管式操作, 荧光 PCR 检测, 不容易产生环境污染。</li> <li>6. 本产品只能用于科研, 本试剂盒足够 50 次 20uL 体系的 PCR。</li> </ol>																							
<p><b>规格及成分</b></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×qPCR MagicMix</td> <td>90408</td> <td>0.5 mL (棕色)</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>180701</td> <td>1 mL (黄盖)</td> </tr> <tr> <td>嗜麦芽窄食单胞菌 PCR 引物</td> <td>14-90700yw</td> <td>100 μL (白盖)</td> </tr> <tr> <td>嗜麦芽窄食单胞菌阳性对照 (1×10E8 拷贝/μL)</td> <td>14-90700pc</td> <td>50 μL (红盖)</td> </tr> <tr> <td>天净沙 DNA 释放剂试用装</td> <td>130982</td> <td>50 次 (试用装)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>14-90700sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	十孔盒包装	2×qPCR MagicMix	90408	0.5 mL (棕色)	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (黄盖)	嗜麦芽窄食单胞菌 PCR 引物	14-90700yw	100 μL (白盖)	嗜麦芽窄食单胞菌阳性对照 (1×10E8 拷贝/μL)	14-90700pc	50 μL (红盖)	天净沙 DNA 释放剂试用装	130982	50 次 (试用装)	使用手册	14-90700sc	1 份
成分	编号	十孔盒包装																						
2×qPCR MagicMix	90408	0.5 mL (棕色)																						
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (黄盖)																						
嗜麦芽窄食单胞菌 PCR 引物	14-90700yw	100 μL (白盖)																						
嗜麦芽窄食单胞菌阳性对照 (1×10E8 拷贝/μL)	14-90700pc	50 μL (红盖)																						
天净沙 DNA 释放剂试用装	130982	50 次 (试用装)																						
使用手册	14-90700sc	1 份																						
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输, -20℃保存, 保存期限为 12 个月。</p>																							
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>样品 DNA。</p>																							
<p><b>使用方法</b></p>	<p>一、<b>稀释标准曲线样品</b> (以 10E2-10E7 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例)。</p> <p>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。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 标记 6 个离心管, 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。</li> <li>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)。</li> <li>3. 在 7 号管中加入 5 μL 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震</li> </ol>																							

荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。

4. 换枪头, 在 6 号管中加入  $5 \mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 5 号管中加入  $5 \mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  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, 必须设置 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  $10\mu\text{L}$  上步制备的标准曲线样品的第 4 号 (浓度为  $1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,  $10\mu\text{L}$  相当于 1 万拷贝) 或第 5 号 (浓度为  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,  $10\mu\text{L}$  相当于 10 万拷贝) 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。如果每次制备需要  $200\mu\text{L}$  样品, 则 PC 和 NC 的体积也必须是  $200\mu\text{L}$ 。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA, 本试剂盒跟市场上大多数细菌 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的细菌 DNAout 或柱式细菌 DNAout。本试剂盒免费赠送 50 次免 DNA 提取的天净沙 DNA 释放剂, 其使用手册可从本公司网站 [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com) 通过搜索产品名称天净沙 DNA 释放剂或产品编号 130982 下载。

## 三、设置 qPCR 反应 ( $20\mu\text{L}$ 体系, 在样品制备室进行)

9. 如果只做 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, 6 个用于标准曲线样品。如果做 2-3 次重复, 则反应设置数量相应增加 2 或 3 倍。
10. 在标记管中按下表加入各成分 (本表只列出一一次重复。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+2 个	PCR 阴性对照管	标准曲线样品管 (2-7 管)
$2 \times$ qPCR MagicMix (棕色管)	$10 \mu\text{L}$	$10 \mu\text{L}$	各 $10 \mu\text{L}$
嗜麦芽窄食单胞菌 PCR 引物混合液 (白盖)	$2 \mu\text{L}$	$2 \mu\text{L}$	各 $2 \mu\text{L}$
自备 $10 \times$ ROX (见注)	$2 \mu\text{L}$	$2 \mu\text{L}$	各 $2 \mu\text{L}$
待测样品 DNA 模板	$6 \mu\text{L}$	不加	不加
第 7 步所得标准曲线样	不加	不加	各 $6\mu\text{L}$ (2 号样到

品稀释液 (2-7 号)		2 号管,3 号样到 3 号管…)
--------------	--	-------------------

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,则用水替代。

11. 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)。

**四、荧光定量 PCR 反应参数**

过程	温度	时间
预变性	94℃	5 min
PCR 反应 (35 个循环)	94℃	0.5 min
	50℃	0.5 min (采集 SYBR 通道的 荧光信号)
	72℃	0.5 min
最后延伸	72℃	10 min

**五、数据处理**

12. 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。

**五、电泳检测**

13. 如果有必要电泳确认,可取 10-20 uL PCR 产物直接在琼脂糖凝胶上电泳产物的大小为 400 bp。

**关联产品**

嗜麦芽窄食单胞菌 LAMP 检测试剂盒