

天
净
沙
系
列

CAT#:14-24600
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

生孢梭菌染料法荧光定量 PCR 试剂盒

Clostridium sporogenes 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; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

| <p>产品及特点</p> | <p>生孢梭菌 (<i>Clostridium sporogenes</i>) 又名产孢梭菌, 能够产生孢子, 为革兰氏染色阳性菌。此菌以周生鞭毛运动, 严格厌氧, 能分解蛋白质和糖类, 能发酵葡萄糖和麦芽糖, 产生丁酸和少量乙酸等, 多存在于土壤、伤口和肠道内。在人体内, 此菌只能在实体肿瘤中生长, 不能在其他组织中 (富氧), 因此具有潜在的医疗价值。本试剂盒是基于 qPCR 技术开发的生孢梭菌快速定量试剂盒, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 根据生孢梭菌的保守序列设计的专一性引物, 与相关细菌无交叉反应。 2. 灵敏度比常规 PCR 高 2-3 个数量级, 可以达到几百拷贝/反应。 3. 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。 4. 一管式荧光定量 PCR 检测, 避免后续污染。 5. 本试剂盒足够 50 次 20μL 反应体系的荧光定量 PCR。 6. 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"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2\timesqPCR MagicMix</td> <td>90408</td> <td>500μL (棕色管)</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>生孢梭菌 PCR 引物混合物</td> <td>14-24600yw</td> <td>100μL (白盖)</td> </tr> <tr> <td>生孢梭菌 PCR 阳性对照 (1\times10E8 copy/μL)</td> <td>14-24600pc</td> <td>50μL (红盖)</td> </tr> <tr> <td>天净沙 DNA 释放剂 (试用装)</td> <td>130982</td> <td>100μL (绿盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>14-24600sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table> | | | 成分 | 编号 | 十孔盒包装 | 2 \times qPCR MagicMix | 90408 | 500 μ L (棕色管) | 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 180701 | 1 mL (黄盖) | 生孢梭菌 PCR 引物混合物 | 14-24600yw | 100 μ L (白盖) | 生孢梭菌 PCR 阳性对照 (1 \times 10E8 copy/ μ L) | 14-24600pc | 50 μ L (红盖) | 天净沙 DNA 释放剂 (试用装) | 130982 | 100 μ L (绿盖) | 使用手册 | 14-24600sc | 1 份 |
| 成分 | 编号 | 十孔盒包装 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 \times qPCR MagicMix | 90408 | 500 μ L (棕色管) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 180701 | 1 mL (黄盖) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 生孢梭菌 PCR 引物混合物 | 14-24600yw | 100 μ L (白盖) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 生孢梭菌 PCR 阳性对照 (1 \times 10E8 copy/ μ L) | 14-24600pc | 50 μ L (红盖) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 天净沙 DNA 释放剂 (试用装) | 130982 | 100 μ L (绿盖) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 使用手册 | 14-24600sc | 1 份 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>运输及保存</p> | <p>低温运输、-20$^{\circ}$C 保存(阳性对照最好和其他试剂分开放置), 有效期一年。</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>自备试剂</p> | <p>DNA 模板、10\timesROX (根据机型决定, 具体见使用方法)。</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>使用方法</p> | <p>一、稀释 PCR 阳性对照 (以 10E2-10E7 这 6 个 10 倍稀释度为例)。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 注意事项: 本产品不提供活体样品做阳性对照, 只提供无污染的 DNA 片段作为阳性对照。由于阳性对照浓度非常高, 因此下列操作一定要在独立的区域进行, 千万不能污染待处理样品或本试剂盒的其他成分。 2. 标记 6 个离心管, 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。 3. 用带芯枪头分别加入 45μL 荧光 PCR 专用模板稀释液 (最好用带芯枪头, 下同)。 4. 在 7 号管中加入 5μL 1\times10E8 拷贝/μL 的阳性对照, 充分震荡 1 分钟, 得 1\times10E7 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。 5. 换枪头, 在 6 号管中加入 5μL 1\times10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1\times10E6 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。 6. 换枪头, 从 6 号管中取 5μL 1\times10E6 拷贝/μL 的阳性对照到 5 号管中, 充分震荡 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

1 分钟，得 1×10^5 拷贝/ μL 的阳性对照。放冰上待用。

7. 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。

二、样品 DNA 的制备

8. 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 $10\mu\text{L}$ 上步制备的阳性对照梯度稀释液中的第 4 号（浓度为 1×10^4 copy/ μL ， $10\mu\text{L}$ 相当于 1 万拷贝）或第 5 号（浓度为 1×10^5 copy/ μL ， $10\mu\text{L}$ 相当于 10 万拷贝）再加上一定量的水（总体积跟处理样品一样，处理阳性体积多少取决于所用试剂盒的要求）作为制备的阳性对照。可以用水作为制备的阴性对照。用自选方法纯化 N+2 个样品的 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一柱式细菌 DNAout。本试剂盒免费赠送不需要 DNA 提取操作的天净沙 DNA 释放剂试用装，其使用手册可以在本公司网站输入天净沙 DNA 释放剂或产品编号 130982 后下载。

三、设置 qPCR 反应（20 μL 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 PCR 阳性对照。如果做 2-3 次重复，则反应设置数量相应增加。

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 | N+2 个制备所得样品 | PCR 阴性对照 | PCR 阳性对照 (2-7 管) |
|--------------------------|------------------|------------------|---|
| 2 \times qPCR MagicMix | 10 μL | 10 μL | 各 10 μL |
| 生孢梭菌 PCR 引物混合物 | 2 μL | 2 μL | 各 2 μL |
| 自备 10 \times ROX (见注) | 2 μL | 2 μL | 各 2 μL |
| 样品制备所得 DNA 模板 (来于第 8 步) | 6 μL | 不加 | 不加 |
| 稀释所得 6 个阳性对照 (来于第 6 步) | 不加 | 不加 | 各 6 μL (2 号样到 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。

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)。

| 过程 | 温度 | 时间 |
|--------------------|-----|-------------|
| 预变性 | 95℃ | 3 分钟 |
| PCR 反应 (40 个循环) | 95℃ | 15 秒 |
| | 60℃ | 60 秒 (数据采集) |
| 溶解曲线分析 | | |

12. 数据采集

在 60℃保温步骤用 SYBR 通道进行荧光数据采集,PCR 结束后再进行溶解曲线分析以排除引物二聚体,具体设计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

13. 如果 PCR 阳性对照和 PCR 阴性对照均得到预期阳性和阴性结果,则说明 PCR 有效,可以进行后续分析。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。

14. 如果 PCR 阳性对照或 PCR 阴性对照任何一个没有得到预期阳性和阴性结果(如 PCR 阳性对照没有扩增,或阴性对照出现扩增),则说明 PCR 实验无效或污染,不需要进行后续分析,需要重复 PCR 或请跟厂家联系。

15. 如果样品制备阳性对照或样品制备阴性对照均得到预期阳性和阴性结果,说明样品制备操作有效,实验结果有效。

16. 如果样品制备阳性对照或样品制备阴性对照任何一个没有得到预期结果(如样品制备阳性对照无扩增,或样品制备阴性对照有扩增),说明样品制备操作无效或有污染,实验结果无效,需要重复样品制备过程或请跟厂家联系。

关联产品

Clostridium sporogenes 生孢梭菌 LAMP 恒温检测试剂盒