

天
净
沙
系
列

CAT#:15-90700
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

嗜麦芽窄食单胞菌探针法荧光定量 PCR 试剂盒
Stenotrophomonas maltophilia Probe 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>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 TaqMan 探针法荧光定量 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"> 1. 即开即用, 用户只需要提供 DNA 模板。 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。 3. 引物和扩增体系经过优化, 灵敏性比常规 PCR 高 100 倍, 可以达到至少数百拷贝/反应。 4. 提供无传染性的 PCR 阳性对照, 便于区分假阴性样品。 5. 一管式封闭操作, 探针法荧光 PCR 检测, 不容易产生环境污染。 6. 本产品只能用于科研, 本试剂盒足够 50 次 20uL 体系的探针法 PCR 体系。 																										
<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×Probe qPCR MagicMix</td> <td>190303</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 (亮黄盖)</td> </tr> <tr> <td>嗜麦芽窄食单胞菌 PCR 引物</td> <td>15-90700yw</td> <td>100 μL (白盖)</td> </tr> <tr> <td>嗜麦芽窄食单胞菌 qPCR 探针 (5uM)</td> <td>15-90700pb</td> <td>50 μL (棕色管)</td> </tr> <tr> <td>嗜麦芽窄食单胞菌阳性对照 2.0 (1×10E8 拷贝/μL)</td> <td>15-90700pc</td> <td>50 μL (黄盖)</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>15-90700sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	十孔盒包装	2×Probe qPCR MagicMix	190303	0.5 mL (棕色)	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (亮黄盖)	嗜麦芽窄食单胞菌 PCR 引物	15-90700yw	100 μL (白盖)	嗜麦芽窄食单胞菌 qPCR 探针 (5uM)	15-90700pb	50 μL (棕色管)	嗜麦芽窄食单胞菌阳性对照 2.0 (1×10E8 拷贝/μL)	15-90700pc	50 μL (黄盖)	天净沙 DNA 释放剂试用装	130982	50 次 (试用装)	使用手册	15-90700sc	1 份
成分	编号	十孔盒包装																									
2×Probe qPCR MagicMix	190303	0.5 mL (棕色)																									
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (亮黄盖)																									
嗜麦芽窄食单胞菌 PCR 引物	15-90700yw	100 μL (白盖)																									
嗜麦芽窄食单胞菌 qPCR 探针 (5uM)	15-90700pb	50 μL (棕色管)																									
嗜麦芽窄食单胞菌阳性对照 2.0 (1×10E8 拷贝/μL)	15-90700pc	50 μL (黄盖)																									
天净沙 DNA 释放剂试用装	130982	50 次 (试用装)																									
使用手册	15-90700sc	1 份																									
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输, -20℃保存, 保存期限为 12 个月。</p>																										
<p>自备试剂</p>	<p>样品 DNA。</p>																										
<p>使用方法</p>	<p>一、稀释标准曲线样品 (以 10E2-10E7 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)。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"> 1. 标记 6 个离心管, 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。 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 7 号管中加入 5 μL 1×10^8 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供),充分震荡 1 分钟,得 1×10^7 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头,在 6 号管中加入 5 μL 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1×10^6 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头,在 5 号管中加入 5 μL 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1×10^5 拷贝/ μL 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 μL 上步制备的标准曲线样品的第 4 号(浓度为 1×10^4 拷贝/ μL , 10 μL 相当于 1 万拷贝)或第 5 号(浓度为 1×10^5 拷贝/ μL , 10 μL 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 μL 样品,则 PC 和 NC 的体积也必须是 200 μL 。
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 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 Probe 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 个用于标准曲线样品。
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 个样品管	PCR 阴性对照管	标准曲线样品管 (2-7 管)
2 \times Probe qPCR MagicMix (棕色管)	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
嗜麦芽窄食单胞菌 PCR 引物混合液 (白盖)	各 2 μL	2 μL	各 2 μL
嗜麦芽窄食单胞菌 qPCR 探针 (5 μM)	各 2 μL	2 μL	各 2 μL

自备 10×ROX (见注)	各 2 μL	2 μL	各 2 μL
N+2 个待测样品 DNA 模板	各 6 μL	不加	不加
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)	不加	不加	各 6μL (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,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	95℃	2 min
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15 sec
	60℃	45 sec (采集 FAM 通道的荧光信号)

五、数据处理

12. 如果进行定量分析,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。

13. 如果进行定性分析,只判断阳性或阴性,则阴性对照 Ct 必须大于或等于 33。阳性对照必须有荧光对数增长,有典型扩增曲线,Ct 值应该小于或等于 28。对待测样品,如果其 Ct 大于或等于 33 则为阴性,如果小于或等于 28 则为阳性。如果在 28-33 之间,则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 33 则为阴性,如果小于 33,则为阳性。

关联产品

嗜麦芽窄食单胞菌可视化 LAMP 检测试剂盒