

产气荚膜杆菌 D 型探针法 qPCR 试剂盒

Clostridium perfringens Type D Probe qPCR Kit

仅

供

科

研

使

用

| <p>产品及特点</p> | <p>产气荚膜杆菌 D 型 (Clostridium perfringens Type D) 主要与羔羊、犊牛等动物的肠毒血症相关。它产生的毒素会导致动物出现急性死亡、剧烈腹泻、肠道炎症等症状，对畜牧业有一定危害。因此快速检测产气荚膜杆菌 D 型具有重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测产气荚膜杆菌 D 型的试剂盒，它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板 2. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/反应。 3. 提供阳性对照，便于制备标准曲线和用作扩增对照，排除假阴性结果。 4. 含识别内源性内参的引物和探针，便于排除 PCR 假阴性样本。 5. 特异性高，靶分子的引物和探针是根据产气荚膜杆菌 D 型 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。 6. 既用于定性检测，又用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。 7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 PCR 反应。 8. 本产品只能用于科研。 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|-----------|--|----|----|----|------------------------|-------|-----------|----------------|-----|-----------|----------------------------------|------|-----------|--------------------------------|------|-----------|------|-----|---|------------|--|--|---|--|--|
| <p>规格及成分</p> | <table border="1" data-bbox="354 1136 1536 1583"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>规格</th> <th>包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×Probe qPCR MasterMix</td> <td>500μL</td> <td>0.5mL 本色管</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>1mL</td> <td>1.5mL 绿盖管</td> </tr> <tr> <td>产气荚膜杆菌 D 型 PCR 引物-探针干粉 (含内参引物探针)</td> <td>50 次</td> <td>0.5mL 白盖管</td> </tr> <tr> <td>产气荚膜杆菌 D 型 PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)</td> <td>50μL</td> <td>0.5mL 黄盖管</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">本产品采用五孔盒包装</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> <p>注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 216 μL 超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。</p> </td> </tr> </tbody> </table> | | | 成分 | 规格 | 包装 | 2×Probe qPCR MasterMix | 500μL | 0.5mL 本色管 | 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 1mL | 1.5mL 绿盖管 | 产气荚膜杆菌 D 型 PCR 引物-探针干粉 (含内参引物探针) | 50 次 | 0.5mL 白盖管 | 产气荚膜杆菌 D 型 PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL) | 50μL | 0.5mL 黄盖管 | 使用手册 | 1 份 | 无 | 本产品采用五孔盒包装 | | | <p>注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 216 μL 超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。</p> | | |
| 成分 | 规格 | 包装 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2×Probe qPCR MasterMix | 500μL | 0.5mL 本色管 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 1mL | 1.5mL 绿盖管 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 产气荚膜杆菌 D 型 PCR 引物-探针干粉 (含内参引物探针) | 50 次 | 0.5mL 白盖管 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 产气荚膜杆菌 D 型 PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL) | 50μL | 0.5mL 黄盖管 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 使用手册 | 1 份 | 无 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 本产品采用五孔盒包装 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 216 μL 超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>使用方法</p> | <p>一、稀释标准曲线样品 (以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例)。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。 2. 在各管中加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液。 3. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

μL 的标准曲线样品。放冰上待用。

4. 换枪头, 在 5 号管中加入 5 μL 1E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。

5. 换枪头, 在 4 号管中加入 5 μL 1E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E4 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阳性样品。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

7. 如果有 N 个样品, 设置 N+2 个提取, 多出的一个是制备 PC (样品制备阳性对照), 一个是制备 NC (样品制备阴性对照)。可以用确认是阳性的样本作为阳性对照, 用确认是阴性的样本作为阴性对照。

8. 用自选方法纯化样品的 DNA, 本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容, 也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qPCR 反应 (20 μL 体系, 在样品制备室进行)

9. 如果做定量分析并且只做 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 (用水做模板), 6 个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+4 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 (用水做模板), 1 个用于 PCR 阳性对照 (直接用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板)。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

10. 在标记管中按下表加入各成分 (本表只列出一次重复) :

| 成分 | 样品管 N+2 个 | PCR 阴性对照 | 标准曲线样品管 (1-6 管) |
|--------------------------------------|--------------|-------------|--------------------|
| 2×Probe qPCR MasterMix | 各 10μL | 10μL | 各 10μL |
| 产气荚膜杆菌 D 型 PCR 引物-探针混合液(含内参引物 探针) | 各 4μL | 4μL | 各 4μL |
| N+2 个待测样 (含内源性内参) | 各 6μL | 不加 | 不加 |

| | | | |
|-------------------------------|----|-----------|-------------|
| 超纯水 | 不加 | 6 μ L | 不加 |
| 第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (含内参, 1-6 号) | 不加 | 不加 | 各 6 μ L |

11. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 PCR:

| 过程 | 温度 | 时间 |
|--------------------|-----------------|---|
| 预变性 | 95 $^{\circ}$ C | 4min |
| PCR 反应 (40 个循环) | 95 $^{\circ}$ C | 15sec |
| | 60 $^{\circ}$ C | 45 sec (采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号, 淬灭基团均为 BHQ) |

四、数据处理

12. 阴性阳性判断: 没有 Ct 读数, 或 Ct 大于 40 判为阴性结果。有 Ct 读数, Ct 值小于 40, 荧光信号有对数增长, 有典型扩增曲线判为阳性结果。每个样本需要对 FAM 通道和 Cy5 通道的结果分别进行判定, 得到两个结果。

13. 实验有效性判断: 如果扩增阳性对照或制备阳性对照 FAM 通道结果为阴性则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要分析原因, 可能是操作、仪器和试剂三方面的原因, 重做扩增或制备或跟仪器和试剂厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照 FAM 通道结果为阳性, 说明环境污染, 则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要分析失败原因, 直到污染消除。如果阳性对照和阴性对照正常, 则进入下一步分析样本的有效性。

14. 样本有效性判断: 如果样本 FAM 通道的结果为阳性, 则无论内参 Cy5 通道的结果是阴性还是阳性, 样本的结果均有效。如果样本结果为阴性, 内参通道结果也为阴性, 则此样品的阴性结果无效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。

15. 如果把本试剂盒用于定量检测, 则以阳性对照浓度的 log 值为横轴, 分别以阳性对照 FAM 通道和内参 Cy5 通道的 Ct 值为纵轴, 绘制标准曲线, 阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线为斜线, r^2 必须大于 0.95, 内参 Cy5 通道读数的标准曲线为一条跟 X 轴平行的横线。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值, 再推算出其浓度。

| | |
|---------------|--|
| | 16. 如果用于定性实验，对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 没有读数、或 Ct 大于或等于 40 则均为阴性，如果小于 40 则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的待测样本，如果其对应的内参 Cy5 通道也为阴性，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。 |
| PCR 编号 | TW-E10258 |
| 说明书 | 1 份 |
| 自备试剂 | 样品 DNA |
| 运输及保存 | 低温运输，-20℃保存，有效期 1 年 |

生产企业: 上海通蔚实业有限公司

公司地址: 上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603

公司电话: 021-54845833

技术支持: 15800441009