



# 枯草芽孢杆菌荧光定量 PCR 试剂盒

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

官方 Q Q: 2881498548

官方网址: [www.tw-reagent.com](http://www.tw-reagent.com)

监督电话: 021-54845833

## 产品及特点:

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)，是芽孢杆菌属的一种。革兰氏阳性菌，可形成内生抗逆芽孢，芽孢 0.6-0.9×1.0-1.5 微米，椭圆到柱状，位于菌体中央或稍偏，芽孢形成后菌体不膨大。生长、繁殖速度较快，菌落表面粗糙不透明，污白色或微黄色，在液体培养基中生长时，常形成皱褶，是一种需氧菌。可利用蛋白质、多种糖及淀粉，分解色氨酸形成吲哚。在遗传学研究中应用广泛，对此菌的嘌呤核苷酸的合成途径与其调节机制研究较清楚。广泛分布在土壤及腐败的有机物中，易在枯草浸汁中繁殖。有的菌株是 $\alpha$ 淀粉酶和中性蛋白酶的重要生产菌；有的菌株具有强烈降解核苷酸的酶系，故常作选育核苷生产菌的亲株或制取 5'-核苷酸酶的菌种。因此快速灵敏检测枯草芽孢杆菌有重要意义。

本产品就是以 探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测枯草芽孢杆菌的试剂盒。

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，灵敏性高。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据枯草芽孢杆菌高度保守区设计。
5. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。

## 规格及成分:

| 编号  | 成分  | 规格                |
|-----|---|-------------------|
| 试剂一 | 2×Probe qPCR MagicMix                       | 500 $\mu$ L (本色盖) |
| 试剂三 | 荧光 PCR 专用模板稀释液                              | 1mL (黄盖)          |
| 试剂二 | 枯草芽孢杆菌 qPCR 引物混合液                           | 100 $\mu$ L (白盖)  |
| 试剂四 | 枯草芽孢杆菌 qPCR 探针                              | 50 $\mu$ L (棕色管)  |
| 试剂五 | 枯草芽孢杆菌探针法 qPCR 阳性对照( $1 \times 10^8/\mu$ L) | 50 $\mu$ L (红盖)   |
|     | 使用手册  | 1 份               |

## 运输及保存:

低温运输，-20°C保存，保存期限为 12 个月。



## 自备试剂：

样品 DNA。

## 使用方法：

### 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。

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 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E7 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 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 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 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 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，最好设置 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 10μL 阳性对照的 10000 倍稀释液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。
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。

### 三、Probe qPCR 反应(20μL 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 (用第 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。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)：

| 成份                     | N+2 个<br>样品管 | PCR 阴性<br>对照管 | 标准曲线样品管 2-7 管                |
|------------------------|--------------|---------------|------------------------------|
| 2×Probe qPCR MagicMix  | 10μL         | 10μL          | 各 10μL                       |
| 枯草芽孢杆菌 qPCR 探针         | 1μL          | 1μL           | 各 1μL                        |
| 枯草芽孢杆菌探针法 qPCR 引物混合液   | 2μL          | 2μL           | 各 2μL                        |
| N+2 个待测 DNA 模板         | 7μL          | --            | --                           |
| 超纯水                    | --           | 7μL           | --                           |
| 第 7 步所得标准曲线样品稀释液 2-7 号 | --           | --            | 各 7μL 2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管 |



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°C | 3 min                 |
| PCR 反应 40 个循环 | 95°C | 15 sec                |
|               | 60°C | 1 min(采集 FAM 通道的荧光信号) |

**四、数据处理：**

12. 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，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 RNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。

13. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照 Ct 必须大于或等于 40。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 30。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性，如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。若重复结果 Ct 值小于 40，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

**五、特别提示：**

本公司的所有产品，仅可用于科研实验，严禁用于临床医疗及其他非科研用途！