

阴沟肠杆菌探针法荧光定量 PCR 试剂盒

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

咨询 QQ : [2881498726](https://www.qq.com)

订购热线 : [021 - 54720761](tel:021-54720761)

咨询电话 : [13166274233\(微信同号\)](https://www.wechat.com)

产品及特点:

阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)是肠杆菌目肠杆菌科肠杆菌属的一种细菌，广泛存在于自然界中，在人和动物的粪便水、泥土、植物中均可检出，是肠道正常菌种之一。其引起的细菌感染性疾病，常累及多个器官系统，包括皮肤软组织感染、泌尿道感染呼吸道感染以及败血症等由于阴沟肠杆菌能产生超广谱β内酰胺酶(extended-spectrum β-lactamases, ESBLs)和 Amp C 酶耐药情况严重，给临床治疗带来了新的挑战。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阴沟肠杆菌的试剂盒。

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，引物是根据阴沟肠杆菌高度保守区设计，不会跟其他病毒 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20μL 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	500μL (本色盖)
试剂三	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL (黄盖)

试剂二	阴沟肠杆菌杆菌属通用 PCR 引物混合液	100 μ L (白盖)
试剂四	阴沟肠杆菌 qPCR 探针	50 μ L (棕色管)
试剂五	阴沟肠杆菌 qPCR 阳性对照(1 \times 10E8/ μ L)	50 μ L (红盖)
	使用手册	1 份

运输及保存:

低温运输, -20 $^{\circ}$ 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/ μ L 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 μ L 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 μ L 1 \times 10E8 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1 \times 10E7 拷贝/ μ 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 μ L 1 \times 10E7 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1 \times 10E6 拷贝/ μ 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 μ L 1 \times 10E6 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1 \times 10E5 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。
6. 放冰上待用。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 10 μ L 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 (20 μ L 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 样品管	PCR 阴性 对照管	标准曲线 样品管 (2-7 管)
2 \times Probe qPCR MagicMix	10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
阴沟肠杆菌 qPCR 探针	1 μ L	1 μ L	各 1 μ L
阴沟肠杆菌 qPCR 引物混合液	2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
N+2 个待测 DNA 模板	7 μ L	--	--
超纯水	--	7 μ L	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)	--	--	各 7 μ L (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 $^{\circ}$ C	3 min
PCR 反应 40 个循环	95 $^{\circ}$ C	15 sec
	60 $^{\circ}$ 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 C_t 值为纵轴, 绘制标准曲线。再以待测样品的 C_t 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 C_t 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, C_t 值应该小于或等于 30。对待测样品, 如果其 C_t 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 C_t 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。

所有产品仅供科研使用, 不得用于其他用途。