Gelatins®

江蓝纯

产气荚膜梭状芽孢杆菌 B 型探针法 qPCR 试剂盒

Clostridium perfringens Type B Probe qPCR Kit

货号：JLC_Y7414

使

用

说

明

书

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

<table>
<tr><td>产品及特点</td><td>产气荚膜梭状芽孢杆菌 B 型（Clostridium perfringens Type B）主要与羔羊痢疾等疾病有关。产气荚膜梭状芽孢杆菌 B 型可导致羔羊发生剧烈腹泻、肠道出血坏死等病变，对羔羊的健康和生命造成严重威胁。因此快速检测产气荚膜梭状芽孢杆菌 B 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梭状芽孢杆菌 B 型的试剂盒，<u>它具有下列特点</u>：
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梭状芽孢杆菌 B 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。</td></tr>
<tr><td>规格及成分</td><td><table>
<tr><th>成分</th><th>规格</th><th>包装</th></tr>
<tr><td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>500 μL</td><td>0.5 mL 本色管</td></tr>
<tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>1 mL</td><td>1.5 mL 绿盖管</td></tr>
<tr><td>产气荚膜梭状芽孢杆菌 B 型 PCR 引物-探针干粉（含内参引物探针）</td><td>50 次</td><td>0.5 mL 棕色管</td></tr>
<tr><td>产气荚膜梭状芽孢杆菌 B 型 PCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)</td><td>50 μL</td><td>0.5 mL 黄盖管</td></tr>
<tr><td>使用手册</td><td>1 份</td><td>无</td></tr>
<tr><td colspan="3">本产品采用五孔盒包装</td></tr>
<tr><td colspan="3">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 216uL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>使用方法</td><td><u>一、稀释标准曲线样品</u>（以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例）。
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/</td></tr>
</table>

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

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 10 μL	10 μL	各 10 μL
产气荚膜梭状芽孢杆菌 B 型 PCR 引物-探针混合液(含内参引物探针)	各 4 μL	4 μL	各 4 μL
N+2 个待测样（含内源性内参）	各 6μL	不加	不加

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

超纯水	不加	6 μL	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 μL

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℃	4 min.
PCR 反应（40 个循环）	95℃	15 sec.
	60℃	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，r2 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

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

	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。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。
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：上海机纯实业有限公司

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：021-54720761

技术支持：13166274223

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.