



地衣形芽孢杆菌探针法荧光定量 PCR 试剂盒

产品及特点：

地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）是一种在土壤中常见的革兰氏阳性嗜热细菌。在鸟类，特别是居住在地面的鸟类（如雀科）和水生的鸟类（如鸭）的羽毛中也能找到这种细菌，特别是在其胸部和背部的羽毛中。酶分泌的最适温度为 37℃。它可能以孢子形式存在，从而抵抗恶劣的环境。在良好环境下，则可以生长态存在。该细菌可调整菌群失调达到治疗目的，可促使机体产生抗菌活性物质、杀灭致病菌。能产生抗活性物质，并具有独特的生物夺氧作用机制，能抑制致病菌的生长繁殖。

因此快速检测地衣芽孢杆菌具有重要意义。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地衣芽孢杆菌的试剂盒。

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，引物是根据地衣形芽孢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。
6. 本产品只能用于科研。

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	地衣形芽孢杆菌 qPCR 引物混合液	100μL（白盖）



试剂四	地衣形芽孢杆菌 qPCR 探针	50 μ L (棕色管)
试剂五	地衣形芽孢杆菌探针法 qPCR 阳性对照($1\times 10^8/\mu$ L)	50 μ 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 10^2 - 10^7 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 1×10^8 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^7 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 1×10^7 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^6 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 1×10^6 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^5 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 $10\mu\text{L}$ 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 ($20\mu\text{L}$ 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后再才设置阳性对照，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×Probe qPCR MagicMix	$10\mu\text{L}$	$10\mu\text{L}$	各 $10\mu\text{L}$
地衣形芽孢杆菌 qPCR 探针	$1\mu\text{L}$	$1\mu\text{L}$	各 $1\mu\text{L}$
地衣形芽孢杆菌探针法 qPCR 引物混合液	$2\mu\text{L}$	$2\mu\text{L}$	各 $2\mu\text{L}$
$N+2$ 个待测 DNA 模板	$7\mu\text{L}$	--	--
超纯水	--	$7\mu\text{L}$	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)	--	--	各 $7\mu\text{L}$ (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°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。

上海纪宁实业有限公司(www.shjning.com)所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。