



肉毒梭状芽孢杆菌探针法荧光定量 PCR 试剂盒

产品及特点:

肉毒梭状芽孢杆菌广泛存在于自然界，是一种专性厌氧的腐生菌，革兰阳性，菌体粗大，具有 4~8 根周毛性鞭毛、运动迟缓，没有荚膜，芽孢卵圆形、近端位、芽孢比繁殖体宽。肉毒梭菌产生的肉毒毒素本质是蛋白质，为神经毒素，共产生六种毒素:A、B、C、D、E、F，其中的 A、B、E、F 与人类的食物中毒有关。肉毒毒素毒性剧烈，少量毒素即可产生症状甚至致死，对人的致死量为 0.1μg。毒素摄入后经肠道吸收进入血液循环，输送到外围神经，毒素与神经有强的亲和力，阻止乙酰胆碱的释放，导致肌肉麻痹和神经功能不全。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肉毒梭状芽孢杆菌的试剂盒。

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，引物是根据肉毒梭状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。

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	肉毒梭状芽孢杆菌 qPCR 引物混合液	100μL (白盖)
试剂四	肉毒梭状芽孢杆菌 qPCR 探针	50μL (棕色管)
试剂五	肉毒梭状芽孢杆菌探针法 qPCR 阳性对照(1×10E8/μL)	50μL (红盖)
	使用手册	1 份



运输及保存：

低温运输，-20℃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
肉毒梭状芽孢杆菌 qPCR 探针	1 μ L	1 μ L	各 1 μ L
肉毒梭状芽孢杆菌探针法 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
	95 $^{\circ}$ 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 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。