

非结核分枝杆菌探针法 qPCR 试剂盒

Nontuberculous mycobacteria Probe qPCR Kit

目录号: [ml107650](#)

使 用 说 明 书

产品及特点

非结核分枝杆菌 (Nontuberculous mycobacteria, NTM) 是指结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 与麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*) 以外的分枝杆菌。非结核分枝杆菌是一种条件致病菌, 广泛存在于水、土壤和气溶胶中。该类菌可致免疫力低下者广泛感染, 轻者可至皮肤感染, 重者会危及生命, 给人类健康带来极大威胁。因此, 快速检测非结核分枝杆菌具有重要的意义。为此, 本公司以探针法 qPCR 技术为基础开发了非结核分枝杆菌的检测试剂盒, **它具有下列特点:**

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, 灵敏度高, 低检测限可达 1000 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。

	4. 特异性高，引物是根据非结核分枝杆菌基因组 DNA 高度保守区设计，不会跟其它生物的 DNA 发生交叉反应。 5. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时，线性范围至少 5 个数量级。 6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。 7. 本产品只能用于科研。																											
规格及成分	<table><tr><th>成分</th><th>规格</th><th>包装</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>500μL</td><td>0.5mL 本色盖</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>1mL</td><td>1.5mL 绿盖管</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>1mL</td><td>1.5mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>非结核分枝杆菌 qPCR 引物-探针干粉</td><td>50 次</td><td>0.5mL 白盖管</td></tr><tr><td>非结核分枝杆菌阳性对照(1E7 拷贝/μL)</td><td>50μL</td><td>0.5mL 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离心，然后在离心管中加入 165 mL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。</td></tr></table>	成分	规格	包装	2×Probe qPCR MasterMix	500μL	0.5mL 本色盖	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管	超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管	非结核分枝杆菌 qPCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 白盖管	非结核分枝杆菌阳性对照(1E7 拷贝/μL)	50μL	0.5mL 黄盖管	使用手册	1 份	无	本产品采用五孔盒包装			注 意： 引物-探针干粉在使用前需要离心，然后在离心管中加入 165 mL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。		
成分	规格	包装																										
2×Probe qPCR MasterMix	500μL	0.5mL 本色盖																										
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管																										
超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管																										
非结核分枝杆菌 qPCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 白盖管																										
非结核分枝杆菌阳性对照(1E7 拷贝/μL)	50μL	0.5mL 黄盖管																										
使用手册	1 份	无																										
本产品采用五孔盒包装																												
注 意： 引物-探针干粉在使用前需要离心，然后在离心管中加入 165 mL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。																												
使用方法	一、稀释标准曲线样品（以 1E1-1E6 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。本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供 DNA 片段作为阳性对照。 1. 标记 6 个离心管，分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。 2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，好用带芯枪头（下同）。 3. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡混匀 1 分钟，得到 1E6																											

拷贝/ 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), 充分震荡混匀 1 分钟, 得到 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(上步所得), 充分震荡混匀 1 分钟, 得到 1E4 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。

6. 依次重复上面的操作得到 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, 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 μL 上步所得 4 号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样品 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。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加) :

成分	样品管 N+3 个	PCR 阴性对照	标曲样品管 (1-6)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL

	非结核分枝杆菌 qPCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL											
	待测样本 DNA 模板	7μL	不加	不加											
	超纯水	不加	7μL	不加											
	第 6 步所得标准曲线样品稀释液(1-6 号)	不加	不加	各 7μL											
	11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：														
<table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>5min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (40 个循环)</td><td>95℃</td><td>15sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60sec（采集 FAM 通道，淬灭基团为 TAMRA）</td></tr></table>					过程	温度	时间	预变性	95℃	5min	PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15sec	60℃	60sec（采集 FAM 通道，淬灭基团为 TAMRA）
过程	温度	时间													
预变性	95℃	5min													
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15sec													
	60℃	60sec（采集 FAM 通道，淬灭基团为 TAMRA）													
四、数据处理															
12. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系，购买新的引物和探针。 13. 如果阴性对照和阳性对照正常，则实验有效，可以进入后续分析。 14. 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 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。 15. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 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 40，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 40，则为阴性。如果 Ct 小于 40 则为阳性。															
自备试剂	超纯水，样品 DNA。														
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。														

