



荧光定量 PCR 阪崎肠杆菌检测试剂盒

使用说明书

【原理与用途】

本品从培养的菌液中提取基因组，针对阪崎肠杆菌保守区18S RNA序列，设计引物探针，在引物的指导下，以四种脱氧核苷酸为底物，通过耐热DNA聚合酶的酶促作用，对DNA进行体外扩增。用Taqman探针法检测扩增产物。

【试剂盒组成】（50人份）

基因组提取部分：

1.裂解液（LB）	25ml
2.清洗液（WB）	6ml（第一次使用前加入 18ml 无水乙醇）
3.洗脱液（EB）	3ml
4.吸附柱	50 个
5.离心管	50个

荧光定量PCR反应部分：

1. PCR反应液	1.2ml×1支
2. Taq 酶	100μl×1支
3.阴性对照	20 μl × 1支
4.定量对照I 3.2×10^8 copies/ml	20 μl × 1支
5.定量对照II 3.2×10^7 copies/ml	20 μl × 1支
6.定量对照III 3.2×10^6 copies/ml	20 μl × 1支

注：氯仿、无水酒精自备

【适用仪器】

ABI、Roche、MJ、Bio-rad、Eppendorf等多种全自动荧光定量PCR检测仪

【操作步骤】

1. 菌体基因组DNA提取

1.1 取培养后的菌液约 1.5-2.0ml，然后 12000rpm，离心 2 分钟，去上清，然后加入 500ul 的裂解液（LB），剧烈混匀（约 20 秒），然后加入 200ul 的氯仿，剧烈振荡 20 秒，然后 15,000 离心 5 分钟，取上清液转入到吸附柱，9000rpm 离心 1min，弃滤液。



1.2 在吸附柱内加入 500ul 的清洗液 WB（第一次使用前加入 18ml 无水乙醇），9000rpm 离心 1min，弃滤液。

1.3 再 15000rpm 离心 2min，以彻底去除残余。

1.4 将吸附柱重新放在一新的离心管中，加入 50ul 的洗脱液 EB。10,000rpm 离心 1min，收集管内的溶液即为核酸溶液，可用于后续的荧光 PCR。注：阴/阳性对照不需要抽提。

2. 荧光定量 PCR 检测

取出 PCR 反应液，室温融化后取相应份数（反应液 24 μ l/T、Taq 酶 2 μ l/T）混匀，向每个 PCR 反应管内加入 26 μ l；再分别加入 4 μ l 上述提好的 DNA 模板或者阴阳性对照，盖好管盖；将反应管置于全自动荧光 PCR 检测仪中，参照仪器操作说明设定阴/阳性对照、待检样本参数进行 PCR 反应，记录好样本摆放顺序。

● PE5700、7700、icycler、FTC2000、mastercycler 等荧光仪的程序设置

先在 37 $^{\circ}$ C 反应 2 分钟，然后 94 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟，再按 94 $^{\circ}$ C 30 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 60 秒 循环 40 次。

● lightcycler 荧光仪的程序设置

反应管置于 LightCycler 自动荧光 PCR 仪上，37 $^{\circ}$ C 反应 2 分钟，94 $^{\circ}$ C 2 分钟，再按 94 $^{\circ}$ C 5 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 30 秒 循环 40 次，每个循环的升降温速率为 20 $^{\circ}$ C/S，每个循环在 60 $^{\circ}$ C 30 秒处进行荧光检测设置。

【结果分析与判断】

1、基线设定

1.1 PE5700、7700、FTC2000:

分析前把参比荧光定为 TAMRA，如果没有 Ct<16 的强阳性标本，就选 3-15 个循环的平均荧光信号为基线分析；如果有 Ct<16 的强阳性标本，就将此标本定为 AFUMI DNA>10¹⁰ copy/ml，并将此样品从数据库中剔除，再以 3-15 个循环的平均荧光信号为基线再分析 Ct。

1.2 iCycler

基线一般按照自设值（2-10）即可，在实验结束后，选择 PCR baseline subtract 选项扣除基线值。若某些曲线出现了规则的剧烈的跳动，应视为非正常情况，将其从结果中剔除（击活 select wells 将此孔彩色点去，然后选择 display wells）并注意调整坐标，使所有曲线都在坐标以内。

1.3 lightcycler

用荧光记数值 F1/F2 读取结果。基线设定原则以超过正常阴性对照扩增曲线的最高点，且 Ct 值不出现任何数值为准（一般在 0.001-0.05 范围内）。

2、阈值设定

以刚好高于阴性对照品的扩增曲线最高点，且阴性对照品 Ct=40 或 0 为原则，调整起始阈值。

3、结果分析

3.1 Ct<16 的强阳性标本，报告为 DNA>10¹⁰ copy/ml。

3.2 38>Ct>16 的标本，按参比曲线计算浓度报告。



3.3 当 Ct=40 或 0 时，报告为阴性。

【注意事项】

- 1 最好是奶粉经过菌体的培养后再取菌液做检测。
- 2 试剂盒各组份使用前请充分融化并摇匀,离心管内的试剂需离心数秒后使用。
- 2 PCR操作各阶段应在不同实验室进行。
- 3 在试剂和标本准备阶段使用负压超净台。
- 5 应穿工作服，戴一次性手套（经常替换手套），使用一次性用品。
- 6 PCR操作人员应具有经验和受过培训。
- 7 操作过程中用到的超净台、移液器、离心机、扩增仪等仪器设备应经常用10%次氯酸或70%乙醇或紫外灯处理。
- 8 阳性对照应和待检标本平行进行操作后方可进行PCR扩增。
- 9 使用本试剂盒应视为有传染性物质，请按传染病实验室检查规程操作。
- 10 本试剂盒仅供科研使用。

【试剂储存条件】

贮存于-20℃

【有效期】

本试剂盒有效期为6个月。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市吴河路 328 号 A 座 2 楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：021-54460831 54460832

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址： www.shinegene.org.cn