

细菌和真菌双重探针法 PCR 试剂盒

Bacteria and Fungus Duplex Probe PCR Kit

目录号: [ml107647](#)

使 用 说 明 书

产品及特点

细菌 (Bacteria) 和真菌 (Fungus) 是两类重要的微生物。细菌是单细胞生物, 个体微小, 结构简单, 没有成形的细胞核, 属于原核生物。细菌形态多样, 有球状、杆状和螺旋状等。细菌广泛分布于自然界, 在物质循环、生物共生等方面发挥着重要作用。但部分细菌能引起人类和动植物的多种疾病。真菌具有真正的细胞核, 属于真核生物。真菌形态和大小差异较大, 有单细胞的酵母菌, 也有多细胞的霉菌和大型真菌。真菌在食品加工、酿造、医药生产等领域有重要应用, 然而也有一些真菌会引发人类和动植物的感染性疾病。总之, 细菌和真菌在生态系统和人类生活中既有有益的一面, 也可能带来一定的危害。因此对细菌和真菌进行快速检测具有重要的意义。本产品就是以探针法 PCR 技术为基础开发的专门对细菌和真菌进行检测的试剂盒, **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，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于排除假阴性结果。
4. 特异性高，引物是根据细菌和真菌 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品只能用于定性分析，不推荐用于定量分析。
6. 细菌的探针用 FAM 标记，真菌的探针用 Cy5 标记。
7. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	0.5mL	0.5mL 本色盖
细菌和真菌双重 PCR 引物-探针干粉	50 次	1.5mL 棕色管
细菌 PCR 阳性对照(1E4 拷贝/ μ L)	250 μ L	0.5mL 黄盖管
真菌 PCR 阳性对照(1E4 拷贝/ μ L)	250 μ L	0.5mL 白盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用五孔盒包装		
<p>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 220 mL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。</p>		

使用方法

一、样品 DNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，好设置 N+3 个提取，多出的一个是细菌样品制备的 PC（阳性对照），一个是真菌样品制备的 PC，一个是样品制备 NC（阴性对照）。可以用 10 μ L 细菌 PCR 阳性对照（1E4 拷贝/ μ L）再加上一一定量的水使总体积跟样本制备试剂盒所要求的起始样本体积一样，以此作为细菌样品制备 PC；可以用 10 μ L 真菌 PCR 阳性对照（1E4 拷贝/ μ L）再加上一一定量的水使总体积跟

样本制备试剂盒所要求的起始样本体积一样，以此作为真菌样品制备 PC。另外用水作为样品制备 NC，水的总体积需要跟样本制备试剂盒所要求的样本体积一样。

2. 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)

1. 做定性分析只做 1 次重复，需标记 N+3+3 个 PCR 管，其中 N+3 个用于上步得到的 N+3 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于细菌 PCR 阳性对照，1 个用于真菌 PCR 阳性对照。

2. 按照下表在各 PCR 管中加入下列成分：

成分	样品管 N+3 个	PCR 阴性对照	细菌 PCR 阳性对照	真菌 PCR 阳性对照
2×Probe qPCR MasterMix	各 10μL	10μL	10μL	10μL
细菌和真菌双重 PCR 引物-探针混合液	各 4μL	4μL	4μL	4μL
N+3 个待测 DNA 样本	各 6μL	不加	不加	不加
超纯水	不加	6μL	6μL	6μL
细菌 PCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	各 5μL	不加
真菌 PCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	5μL

3. 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	5min
PCR 反应 (45 个循环)	95°C	15sec
	60°C	30sec (采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号，淬

			灭基团均为 TAMRA)
	<p>四、数据处理</p> <p>4. 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。</p> <p>5. 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。</p> <p>6. 对定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照的 Ct 必须大于 40，或者没有 Ct 值。阳性对照的荧光信号必须有对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于 40。对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 大于 40 则为细菌阴性，如果小于或等于 40 则为细菌阳性。如果其 Cy5 通道的 Ct 大于 40 则为真菌阴性，如果小于或等于 40 则为真菌阳性。</p>		
自备试剂	超纯水，样品 DNA。		
运输及保存	低温运输，-20°C保存，有效期 1 年。		