



肠球菌通用探针法 qPCR 试剂盒

Enterococcus spp. Probe qPCR Kit

仅

供

科

研

使

用

产品及特点

肠球菌（Enterococcus spp.）属肠球菌属，是人类和动物肠道正常菌群的一部分，通常在引起腹腔和盆腔感染所分离的混合菌丝中发现，既往认为肠球菌是对人类无害的共栖菌，但近年研究已证实了肠球菌的致病力。在需氧革兰阳性球菌中，它是仅次于葡萄球菌的重要院内感染致病菌，肠球菌亦可引起院外感染。肠球菌不仅可引起尿路感染、皮肤软组织感染，还可引起危及生命的腹腔感染、败血症、心内膜炎和脑膜炎等，因此快速检测肠球菌通用具有重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测肠球菌通用的试剂盒，**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，便于制备标准曲线和用作扩增对照，排除假阴性结果。
- 4. 含识别内源性内参的引物和探针，便于排除 PCR 假阴性样本。
- 5. 特异性高，靶分子的引物和探针是根据肠球菌通用 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
- 6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。
- 7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 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	500μL	0.5mL 本色管
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
肠球菌通用 qPCR 引物-探针干粉(含内参引物探针)	50 次	0.5mL 白盖管
肠球菌通用 qPCR 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短暂离心，然后在离心管中加入 220 μL 超纯水充分混匀后得到引物-探针混合液再使用，未用完的需要-20℃保存。		

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例）。

- 1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。

- 2. 在各管中加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液。
- 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 1 分钟, 得 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 1 分钟, 得 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(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E4 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
- 6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线阳性样品。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

- 7. 如果有 N 个样品, 设置 N+2 个提取, 多出的一个是制备 PC (样品制备阳性对照), 一个是制备 NC (样品制备阴性对照)。可以用确认是阳性的样本作为阳性对照, 用确认是阴性的样本作为阴性对照。
- 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, 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) :

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL

肠球菌通用 qPCR 引物-探针混合液(含内参引物探针)	各 4μL	4μL	各 4μL
N+2 个待测样 (含内源性内参)	各 6μL	不加	不加
超纯水	不加	6μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 6μL

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℃	4min
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15sec
	60℃	45 sec (采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 BHQ)

四、数据处理

12. 阴性阳性判断：没有 Ct 读数，或 Ct 大于 40 判为阴性结果。有 Ct 读数，Ct 值小于 40，荧光信号有对数增长，有典型扩增曲线判为阳性结果。每个样本需要对 FAM 通道和 Cy5 通道的结果分别进行判定，得到两个结果。

13. 实验有效性判断：如果扩增阳性对照或制备阳性对照 FAM 通道结果为阴性则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析原因，可能是操作、仪器和试剂三方面的原因，重做扩增或制备或跟仪器和试剂厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照 FAM 通道结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析失败原因，直到污染消除。如果阳性对照和阴性对照正常，则进入下一步分析样本的有效性。

14. 样本有效性判断：如果样本 FAM 通道的结果为阳性，则无论内参 Cy5 通道的结果是阴性还是阳性，样本的结果均有效。如果样本结果为阴性，内参通道结果也为阴性，则此样品的阴性结果无效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。

15. 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，分别以阳性对照 FAM 通道和内参 Cy5 通道的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线为斜线，

	r2 必须大于 0.95，内参 Cy5 通道读数的标准曲线为一条跟 X 轴平行的横线。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。 16. 如果用于定性实验，对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 没有读数、或 Ct 大于或等于 40 则均为阴性，如果小于 40 则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的待测样本，如果其对应的内参 Cy5 通道也为阴性，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。
PCR 编号	TW-E10270
说明书	1 份
自备试剂	样品 DNA
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 1 年

生产企业：上海通蔚实业有限公司

公司地址：上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603

公司电话：021-54845833

技术支持：15800441009