

版本号: FP240619

E. Coli DNA Detection Kit (Probe)

E. Coli DNA检测试剂盒（探针qPCR法）

目录号: FP218-T7

产品内容

产品组成	FP218-T7 (30 μ l \times 20 rxn)
<i>E. Coli</i> qPCR Reaction MasterMix	400 μ l
DNA Dilution Buffer	1 ml

储存条件

收到本产品后, 请立即置于-30~-15 $^{\circ}$ C下保存, 保质期24个月。从-30~-15 $^{\circ}$ C取出使用时, 将冻存的组分融解, 然后充分混匀, 待溶液完全均一后再行使用。如解冻后没有使用, 须彻底混匀后再重新冷冻 (因为在解冻过程中盐会出现分层现象, 未混匀就进行冷冻, 会导致盐晶体的析出, 从而对酶和DNA造成损伤)。如一段时间内经常取用, 可在2-8 $^{\circ}$ C条件下储存3个月。避免反复多次冻融。

产品简介

本产品是通过Probe qPCR法定量检测*E. Coli*细胞基因组DNA的检测试剂盒。试剂盒中的qPCR Reaction MasterMix包含qPCR反应中的所有组分，反应时，只需加入模板即可。检测荧光信号为FAM。

本试剂盒操作简便，反应快速，专一性强，性能可靠，灵敏度高，最低检测限可以达到fg水平。

本产品可搭配TIANGEN的细菌基因组DNA提取试剂盒（客户自备，TIANGEN，目录号：DP302）。

操作步骤

1、qPCR试剂准备

将*E. Coli* qPCR Reaction MasterMix和DNA Dilution Buffer解冻，解冻后充分混匀，短暂离心将溶液收集至管底后置于冰上备用。

2、*E. Coli*基因组DNA的准备

通过细菌基因组提取试剂盒制备*E. Coli*基因组DNA，测定浓度后，利用DNA Dilution Buffer对*E. Coli*基因组DNA进行梯度稀释。建议稀释成如下浓度梯度：

梯度	浓度
梯度1	300 pg/μl
梯度2	30 pg/μl
梯度3	3 pg/μl
梯度4	300 fg/μl
梯度5	30 fg/μl

对于基因组DNA稀释流程，建议操作如下：

- (1) 利用DNA Dilution Buffer将初始浓度的*E. Coli*基因组DNA浓度稀释至3 ng/μl。
- (2) 取10 μl 3 ng/μl的样品加入1.5 ml离心管中，再加入90 μl DNA Dilution Buffer，充分混匀，即得到梯度1样品；取10 μl梯度1样品加入1.5 ml离心管中，再加入90 μl DNA Dilution Buffer，充分混匀，即得到梯度2样品；以此类推得到梯度3-5样品。

3、无模板对照NTC的制备

根据检测需求，需设置无模板对照（NTC），可将RNase-Free ddH₂O或者DNA Dilution Buffer作为模板使用。

4、qPCR反应液准备

(1) 按下表体系进行qPCR反应体系配制：

组成成分	30 μ l 体系
<i>E. Coli</i> qPCR Reaction MasterMix	20 μ l
模板DNA（5个梯度稀释的 <i>E. Coli</i> 基因组DNA以及NTC）	10 μ l

(2) 根据要检测的样本数量，计算所需反应孔数，一般做3个重复孔/样。反应孔数=（5个浓度梯度的标准品+1个无模板对照NTC） \times 3，建议排板如下图：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		梯度1	梯度1	梯度1								
C		梯度2	梯度2	梯度2								
D		梯度3	梯度3	梯度3								
E		梯度4	梯度4	梯度4								
F		梯度5	梯度5	梯度5								
G		NTC	NTC	NTC								
H												

5、扩增程序参数设置（两步法），以ABI 7500 qPCR仪，软件版本2.0.6为例：

(1) 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板；

(2) 在Target Name一栏中创建新的检测探针，命名为“*E. Coli*-DNA”，选择报告荧光基团为“FAM”，淬灭荧光基团为“None”；

(3) 在“Assign target (s) to the selected wells”面板中，将标准曲线孔的“Task”一栏设置为“Standard”，并且在“Quantity”一栏分别赋值为“3000”、“300”、“30”、“3”、“0.3”（含义为每孔的DNA含量，单位为pg），并且在相应的“sample name”一栏中命名为“Std1”、“Std2”、“Std3”、“Std4”、“Std5”；将无模板对照NTC孔的“Task”一栏设置为“NTC”，之后点击“Start Run”，开始仪器运行。



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

6、扩增程序设置如下表：设置反应体积30 μ l。

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1 \times	95 $^{\circ}$ C	2 min	预变性	否
PCR 反应	40 \times	95 $^{\circ}$ C	15 sec	变性	否
		60 $^{\circ}$ C	30 sec	退火/延伸	是

注意：关于ROX矫正的问题说明。本产品检测试剂中已经添加了ROX矫正染料，添加浓度可同时满足需要基础ROX浓度矫正的仪器和需要高ROX浓度矫正的仪器。无需ROX矫正的仪器可不考虑此问题。

结果判读

- 1、结果分析的参数设置（比如Threshold和Baseline等），一般可根据仪器自动给出的参数进行判读，若数据不理想，也可进行手动调整。
- 2、在“Analysis”的“Standard Curve”面板中，可读取标准曲线的 R^2 、扩增效率（Eff%）、斜率（Slope）等参数。正常的标准曲线参数： $R^2 > 0.99$ ；扩增效率在 $90\% \leq \text{Eff}\% \leq 110\%$ 之间；Slope在3.4左右。
- 3、无模板对照NTC的CT值应为Undetermined或CT值 ≥ 35 ，或根据实验室自身验证结果设定具体标准。