Akkermansia muciniphila 核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）

【产品名称】

Akkermansia muciniphila 核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）

【产品介绍】

本试剂盒采用 TaqMan 探针法实时荧光定量 PCR，用于定量检测样本中的嗜黏蛋白阿克曼菌(*Akkermansia muciniphila*，AKK) DNA。试剂盒包含 2× Probe qPCR Mix、 AKK 特异性引物/探针、AKK 定量标准品及核酸稀释液。通过标准品建立标准曲线，并依据样本 Ct 值计算相应拷贝数浓度。

【产品规格和成分】

产品成分	规格
	96 测试/盒
2× Probe qPCR Mix	1 mL
AKK Primer & Probe Mix	300 µL
AKK DNA Quantitative Standard	100 µL
核酸稀释液	10 mL

【储存条件及有效期】

1. 产品收到后置于-20℃避光保存，避免反复冻融；未开封试剂在规定条件下有效期为 12 个月。
2. 运输条件：本试剂盒应在-15℃以下运输。
3. 生产日期及有效期见标签。

【适用机型】

适用于具备相应荧光通道的常规实时荧光定量 PCR 仪，例如 Applied Biosystems 7500 等。

【样本要求】

适用于粪便、肠道内容物、培养物或其他科研样本提取的基因组 DNA；DNA 应无明显 PCR 抑制物；不同样本类型之间不宜直接比较未经归一化的结果。

【检验方法】

1.样本处理（在样本处理区）

使用适合复杂样本的 DNA 提取方法提取待检样本，并设置提取空白对照。AKK DNA Quantitative Standard 使用核酸稀释液进行梯度稀释用于制备标准曲线，如果待检样本提取的 DNA 浓度过高，需使用核酸稀释液梯度稀释至合适的浓度。

2.核酸扩增

2.1 PCR试剂准备**（在试剂准备区）**

取试剂盒中 2× Probe qPCR Mix 和 AKK Primer & Probe Mix 室温融化震荡混匀后，低速瞬离；按照反应体系计算需要使用的量，并配制 PCR 扩增工作液 mix 震荡混匀，低速瞬离，按照 18μL/反应将 PCR 扩增工作液 mix 分装在适配的 PCR 管或 PCR 板中，转移到加样区。

组分	体积（μL）	终浓度/说明
2× Probe qPCR Mix	10.0	1×
AKK Primer & Probe Mix	3.0	-
无核酶水	5.0	-

注：为满足实际使用量，可适当多配制几个反应的 PCR 扩增工作液mix，建议每个反应做3个重复。

2.2 加样**（在样本处理区）**

对应的反应孔中分别加入 2μL 梯度稀释的AKK DNA Quantitative Standard、待检样本提取的合适浓度的DNA、阴性对照样本；盖上管盖或者封膜，离心数秒后转移到扩增检测区进行PCR扩增检测。

2.3 PCR扩增检测**（在扩增区）**

2.3.1 将反应管或反应板放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。

2.3.2 反应程序参数设置：（请参照仪器的操作软件进行设置）

步骤	温度	时间	循环数
污染消化	37℃	2min	1
预变性	95℃	30s	1
变性	95℃	10s	5
退火	55℃	20s	
延伸	72℃	20s	
变性	95℃	10s	40
退火、延伸及检测荧光	58℃	30s	
退火、延伸及检测荧光中58℃时采集荧光，检测通道： FAM			

2.3.3 样本设置：在仪器软件的相应的样本设置窗口内填写各样本的名称、类型。

3.检测结果

根据各类仪器的软件进行定量分析，得到各样本的检测结果（根据不同的仪器、样本检测的具体情况设置基线，阈值线选在阴性对照正常扩增曲线的上方和扩增曲线的指数扩增区间）。

4.结果分析

4.1 将 5 个梯度标准品与待测样本同时扩增，以标准品 $\log_{10}$(拷贝浓度) 为横坐标、Ct 值为纵坐标建立标准曲线。

4.2 建议标准曲线相关系数 $R^2 \geq 0.98$；复孔$|\Delta Ct| \leq 0.5$。

4.3 仪器软件或人工手动依据标准曲线给出样本拷贝数浓度。换算至原始样本时，应结合洗脱体积、反应加样体积、提取起始量及稀释倍数计算。

4.4 结果可按 copies/mL 或经总细菌量、DNA 质量等归一化后报告。

4.5 不同批次比较时应采用一致的提取与分析流程。

【结果判定与质量控制】

项目	合格标准	处理建议
NTC	无典型扩增曲线；Ct 未检出	若出现稳定扩增，排查污染并重做
标准品	扩增曲线呈规则梯度；$R^2 \geq 0.98$	不合格时检查配液、稀释与仪器设置
样本	Ct 位于标准曲线线性范围内	高于上限时稀释；低于下限时报告低于定量限

【使用前注意事项】

1. 实验应划分试剂准备区、样本处理区和扩增检测区，并使用带滤芯枪头，防止气溶胶污染。
2. 标准品为高浓度的核酸，应最后开盖、单独加样；如发生泄漏，应立即进行核酸去污染处理。
3. 反应液应在冰上操作，避免强光照射探针。所有组分充分解冻、混匀并短暂离心后使用。
4. 样本基质、提取效率及 PCR 抑制均会影响定量结果。需要严谨比较时，建议设置外源过程控制或内参。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服、佩戴手套及必要的眼面部防护，并按实验室规范处置废弃物。

【重要说明】

本说明书为按参考版式制作的科研产品技术模板。产品编号、装量、有效期、靶序列、定量范围、检出限及性能指标须由实际生产方完成设计验证后确认，并以最终标签和质量文件为准。