

细菌鉴定试剂盒

Nu-16S0101

试剂盒应用

本试剂盒主要用于细菌 16S rDNA 的快速检测，无需经过繁琐的基因组 DNA 提取纯化，取样后直接 PCR 扩增即可获得 16S rDNA 信息，通过比对 16S 片段序列，最终获得细菌种属信息。

本试剂盒可以检测低至 10^4 个/mL 个细菌，对难培养、珍贵样本、表型不能鉴定的未知细菌快速扩增尤为方便。使用本试剂盒前无需提取纯化，可直接对菌斑、甘油菌或对数生长期菌进行检测，从而大大缩短了检测时间。试剂盒中提供的 16S PCR Premix 已包含有染料，PCR 结束后直接进行琼脂糖凝胶电泳，PCR 产物可直接进行测序分析。

本产品仅供研究使用，不可用于临床、食品、化妆品等领域。

试剂盒组成

组分	Nu-16S0101 (50T)
16S PCR Premix	1.25 mL
16S 上游引物 (10 uM)	50 μ L
16S 下游引物 (10 uM)	50 μ L
阳性对照 (1ng/ μ L)	50 μ L

保存条件

-20°C 保存。使用时请置于冰上。

使用方法**1、样本准备：**

- 1) 菌液：取对数生长期菌液 1-3 μ L 加入 PCR 反应体系中。
- 2) 甘油菌：取 1 μ L 菌液加入 PCR 反应体系中。
- 3) 单菌落：无菌吸头或者无菌牙签挑取单个菌落置于 500 μ L 无菌生理盐水中，涡旋混合均匀，取 1-3 μ L 加入 PCR 反应体系中。

2、推荐 PCR 反应体系

	50 μ L 体系	阴性对照	阳性对照
16S PCR Premix	25 μ L	25 μ L	25 μ L
16S 上游引物*	1 μ L	1 μ L	1 μ L
16S 下游引物*	1 μ L	1 μ L	1 μ L
样本/阳性对照	1-3 μ L	-	1 μ L
ddH ₂ O	补齐至 50 μ L	23 μ L	22 μ L

*：引物浓度可以在 0.1-0.5 μ M 范围内进行调节。

3、按照以下方法设定 PCR 反应

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 °C	10 min	1
变性	95 °C	30 s	} 30-35
退火	50~55 °C	30 s	
延伸	72 °C	1-1.5 min	
彻底延伸	72 °C	10 min	1
	4 °C	Hold	1

4、琼脂糖凝胶电泳

使用 1%琼脂糖凝胶进行电泳，不同菌株电泳片段稍微差别，一般为 1.5kb 左右。

5、PCR 产物回收和测序

使用切胶回收试剂盒进行回收，并使用以下推荐引物进行测序。将 DNA 测序结果与 NCBI 数据库进行比对，确定细菌种类。

测序引物名称	测序引物序列
Seq-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Seq-R	GGTACCTTGTTACGACTT

鉴定菌种类型

菌种名称	英文名称
大肠埃希氏杆菌	<i>Escherichia coli</i>
粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>
梭形芽孢杆菌	<i>Clostridium</i>
短小杆菌	<i>Curtobacterium</i>
肺炎克雷伯菌	<i>Klebsiella pnenmoniae</i>
链球菌	<i>Streptococcus</i>
鲍曼氏不动杆菌	<i>Acinetobacter baumannii</i>
铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

注意事项

- 1、超净台中操作，应佩戴无菌手套，穿实验服，操作前用 75%乙醇对实验器具进行消毒。
- 2、使用无菌吸头和离心管，开盖务必轻柔，减少气溶胶污染。
- 3、尽可能使用 2 次纯化细菌，以提高测序成功率。
- 4、尽可能使用对数生长期的细菌。
- 5、为防止试剂盒污染，请勿将不同批号试剂盒混用。