

上海通尉

TW—reagent.com 上海通尉

嗜肺巴斯德杆菌探针法 qPCR 试剂盒

Pasteurella pneumotropica Probe qPCR Kit

仅

供

科

研

使

用

嗜肺巴斯德杆菌 (*Pasteurella pneumotropica*) 属于巴斯德菌科, 是巴斯德菌属中的一种革兰氏阴性、无动力、无芽孢的短杆或球杆菌。嗜肺巴斯德杆菌是一种条件致病菌, 广泛分布于自然界, 尤其容易感染啮齿类动物, 如小鼠、大鼠和豚鼠。在国内外的实验动物中, 它是目前已知感染率高的病原菌之一。此外, 嗜肺巴斯德杆菌还是人兽共患病原, 能够致使免疫缺陷或免疫功能低下的动物发病, 同时也可能引发人类的局部以及全身感染。可见, 嗜肺巴斯德杆菌作为一种重要的人兽共患病原菌, 对实验动物和人类健康均可能带来严重威胁。因此快速检测嗜肺巴斯德杆菌具有重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测嗜肺巴斯德杆菌的试剂盒, **它具有下**

列特点:

产品及特点

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嗜肺巴斯德杆菌 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 μ L 体系的探针法 qPCR 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	500 μ L	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
嗜肺巴斯德杆菌 qPCR 引物-探针干粉(含内参引物探针)	50 次	0.5mL 白色管
嗜肺巴斯德杆菌 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5mL 黄盖管
使用手册	1 份	1 份
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 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$^{\circ}$C保存。</p>		

使用方法

一、稀释标准曲线样品 (以 1E1-1E6 拷贝/ μ L 这 6 个 10 倍稀释度为例)。由于标准品浓度非常高,因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行,千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分)。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原,本产品不提供活体样品做阳性对照,只提供无传染性的 DNA 片段作为阳性对照。

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 μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液。
3. 在 6 号管中加入 5 μ L 1E7 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供),充分震荡 1 分钟,得 1E6 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头,在 5 号管中加入 5 μ L 1E6 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1E5 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头,在 4 号管中加入 5 μ L 1E5 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟,得 1E4 拷贝/ μ L 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 μ L 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 10μL	10μL	10μL
嗜肺巴斯德杆菌 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（含内参，1-6 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。

	<p>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。</p> <p>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，r^2 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。</p> <p>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。</p>
PCR 编号	TW-E10040
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

上海通尉

技术支持：15800441009