

猪胸膜肺炎放线杆菌染料法荧光定量 PCR 试剂盒

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

咨询 QQ : 2881498726

订购热线 : 021 - 54720761

咨询电话 : 13166274233(微信同号)

产品及特点:

胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)是一种呼吸道寄生菌，主要存在于患病动物的肺部和扁桃体，病猪和带菌猪是本病的主要传染源。本病的感染途径是呼吸道，即通过咳嗽、喷嚏喷出的分泌物和渗出物而传播，而接触传播可能是其主要的传播途径。国内外的研究及临床实践表明，猪患呼吸系统疾病时，容易发生继发感染或混合感染。如本病与猪伪狂犬、兰耳病、多杀性巴氏杆菌、肺炎霉形体、嗜血杆菌等病原的混合感染，应引起高度重视，因此快速检测胸膜肺炎放线杆菌具有重要意义。荧光定量 PCR 是检测传染病的主流技术，本产品就是以染料法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测胸膜肺炎放线杆菌的试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供病毒样品。
2. 根据猪胸膜肺炎放线杆菌保守序列设计的专一性引物，与相关病毒无交叉反应。
3. 灵敏度可以达到几百拷贝/反应。
4. 一管式荧光定量 PCR 检测，避免后续污染。
5. 本试剂盒足够 50 次 20 μ L 反应体系的荧光定量 PCR。

规格及成分:

编号	成分	规格
试剂一	2 $\times$ qPCR MagicMix	500 μ L (棕色管)
试剂二	荧光 PCR 专用模板稀释液	1 mL (黄盖)

试剂三	猪胸膜肺炎放线杆菌染料法 PCR 引物混合液	100 μ L (白盖)
试剂四	猪胸膜肺炎放线杆菌染料法 PCR 阳性对照(1×10^8 拷贝/ μ L)	50 μ L (红盖)
试剂五	DNA 病毒裂解液 (试用装)	15 次 (9 mL)
	使用手册	1 份

运输及保存:

低温运输、 -20°C 保存, 有效期一年。

自备试剂:

DNA 模板、 $10\times\text{ROX}$ (根据机型决定, 具体见使用方法)。

使用方法:

一、稀释 PCR 阳性对照 (以 10^2 - 10^7 拷贝/ μ L 这 6 个 10 倍稀释度为例) :

1. 注意: 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, 只提供可以直接使用的 DNA 片段作为阳性对照。
2. 标记 6 个离心管, 分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。
3. 用带芯枪头分别加入 45 μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液 (最好用带芯枪头, 下同)。
4. 在 7 号管中加入 5 μ L 1×10^8 拷贝/ μ L 的阳性对照, 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^7 拷贝/ μ L 的阳性对照。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 6 号管中加入 5 μ L 1×10^7 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^6 拷贝/ μ L 的阳性对照。放冰上待用。
6. 换枪头, 在 5 号管中加入 5 μ L 1×10^6 拷贝/ μ L 的阳性对照到 5 号管中, 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^5 拷贝/ μ L 的阳性对照。放冰上待用。
7. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备:

8. 如果有 N 个样品，必须设置 $N+2$ 个提取，多出的一个是 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 $10\mu\text{L}$ 上步制备的 PCR 阳性对照的第 4 号（浓度为 1×10^4 拷贝/ μL ， $10\mu\text{L}$ 相当于 1 万拷贝）或第 5 号（浓度为 1×10^5 拷贝/ μL ， $10\mu\text{L}$ 相当于 10 万拷贝）再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。如果每次制备需要 $200\mu\text{L}$ 样品，则 PC 和 NC 的体积也必须是 $200\mu\text{L}$ 。

9. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的一管式病毒 DNAout 或其升级版柱式病毒 DNAout。本试剂盒免费赠送 15 次一管式病毒 DNAout。

三、设置 qPCR 反应 ($20\mu\text{L}$ 体系，在样品制备室进行)：

10. 如果只做 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，6 个用于 PCR 阳性对照。如果做 2-3 次重复，则反应设置数量相应增加 2 或 3 倍。

11. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后最后加）：

成分	样品管 $N+2$ 个	PCR 阴性 对照管	PCR 阳性对照管 (2-7 管)
2×qPCR MagicMix (棕色管)	$10\mu\text{L}$	$10\mu\text{L}$	各 $10\mu\text{L}$
猪胸膜肺炎放线杆菌 PCR 引物混合液 (白盖)	$2\mu\text{L}$	$2\mu\text{L}$	各 $2\mu\text{L}$
自备 10×ROX (见注)	$2\mu\text{L}$	$2\mu\text{L}$	各 $2\mu\text{L}$
$N+2$ 待测样品 DNA 模板	$6\mu\text{L}$	不加	不加
第 7 步所得 PCR 阳性对 照稀释液 (2-7 号)	不加	不加	各 $6\mu\text{L}$ (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管...)

注: 仅 ABI7500、7700 和 7900 仪器需要使用 ROX 作为对照, 其他荧光 PCR 仪器 (如 iCycler IQ、MJ Option、MJ Chromo4、MX3000、MX4000、RotorGene3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480) 不需要使用 ROX, 则用水替代。

12. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 PCR (具体 PCR 参数可以根据仪器不同而自行优化)。

过程	温度	时间
预变性	92°C	5 分钟
PCR 反应 30 个循环	94°C	60 秒
	50°C	60 秒
	72°C	60 秒

13. 数据采集

具体操作按所用仪器推荐的流程进行。本产品中所含的荧光染料在不结合 DNA 时, 最大吸收光谱在 471 nm, 结合 DNA 时的最大吸收光谱在 500 nm, 最大发射光谱在 530 nm。信号采集可以设置在复性或延伸步骤。

四、数据处理:

14. 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, 以 Ct 值为纵轴, 绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值, 再推算出其浓度。

15. 如果把本试剂盒用于定性检测, 只判断阳性或阴性, 则阴性对照 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长, 有典型扩增曲线, Ct 值应该小于或等于 30。对待测样品, 如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性, 如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间, 则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性, 如果小于 40, 则为阳性。

所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。