

## 灭鲑气单胞菌探针法荧光定量 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:

灭鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)是气单胞菌属(*Aeromonas*)细菌的一个种，是引起鲑鳟鱼类疔疮病及溃疡病的最主要病原菌，给鲑科(*Salmonidae*)鱼类养殖带来严重损失。近年来研究表明，该菌宿主范围逐渐扩大，可感染除了鲑科外的其他水产动物，如刺参、斑点叉尾鲴、乌鳢和大菱鲆等。对灭鲑气单胞菌的检测主要依赖于传统的微生物分离培养鉴定方法，其操作过程费时、繁琐，且很难得到准确结果，常常延误病情的诊断，而且对于已感染该菌但尚未发病的鱼类，通过常规分离鉴定方法很难得到准确结果。本产品就是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测灭鲑气单胞菌的试剂盒。

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，灵敏性高。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据灭鲑气单胞菌高度保守区设计，不会跟其他病毒 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
6. 本产品只能用于科研。

### 规格及成分:

| 编号  | 成分                                                 | 规格          |
|-----|----------------------------------------------------|-------------|
| 试剂一 | 2×Probe qPCR MagicMix                              | 500μL (本色盖) |
| 试剂三 | 荧光 PCR 专用模板稀释液                                     | 1mL (黄盖)    |
| 试剂二 | 非灭鲑气单胞菌 qPCR 引物混合液                                 | 100μL (白盖)  |
| 试剂四 | 灭鲑气单胞菌 qPCR 探针                                     | 50μL (棕色管)  |
| 试剂五 | 灭鲑气单胞菌探针法 qPCR 阳性对照( $1 \times 10^8/\mu\text{L}$ ) | 50μL (红盖)   |
|     | 使用手册                                               | 1 份         |

### 运输及保存:

低温运输,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存, 保存期限为 12 个月。

### 自备试剂:

样品 DNA。

### 使用方法:

#### **一、稀释标准曲线样品 (以 $10^2$ - $10^7$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ 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 7, 6, 5, 4, 3, 2。
2. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu\text{L}$  荧光 PCR 专用模板稀释液, 最好用带芯枪头, 下同)。
3. 在 7 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。

6. 放冰上待用。重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

## 二、样品 DNA 的制备：

7. 如果有 N 个样品，最好设置 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 $\mu$ L 阳性对照的 10000 倍稀释液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。

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。

## 三、Probe qPCR 反应（20 $\mu$ 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（用第 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。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）：

| 成份                             | N+2 个样品管   | PCR 阴性对照管  | 标准曲线样品管 (2-7 管)                      |
|--------------------------------|------------|------------|--------------------------------------|
| 2 $\times$ Probe qPCR MagicMix | 10 $\mu$ L | 10 $\mu$ L | 各 10 $\mu$ L                         |
| 灭鲑气单胞菌 qPCR 探针                 | 1 $\mu$ L  | 1 $\mu$ L  | 各 1 $\mu$ L                          |
| 灭鲑气单胞菌探针法 qPCR 引物混合液           | 2 $\mu$ L  | 2 $\mu$ L  | 各 2 $\mu$ L                          |
| N+2 个待测 DNA 模板                 | 7 $\mu$ L  | --         | --                                   |
| 超纯水                            | --         | 7 $\mu$ L  | --                                   |
| 第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号)       | --         | --         | 各 7 $\mu$ L (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管) |

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 $^{\circ}$ C | 3 min                  |
| PCR 反应 40 个循环 | 95 $^{\circ}$ C | 15 sec                 |
|               | 60 $^{\circ}$ C | 1 min (采集 FAM 通道的荧光信号) |

#### 四、数据处理：

12. 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  $C_t$  值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的  $C_t$  值从标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的  $\log$  值，再推算出其浓度。

13. 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  $C_t$  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， $C_t$  值应该小于或等于 30。对待测样品，如果其  $C_t$  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。若重复结果  $C_t$  值小于 40，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

**所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。**