

节瘤拟杆菌探针法荧光定量 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:

节瘤拟杆菌(*Dichelobacter nodosus*)是引起牛、羊、鹿等反刍动物腐蹄病的原发性病原菌,腐蹄病是危害反刍动物养殖业发展的重要疾病之一,节瘤拟杆菌引起动物局部浅表损害,病程缓慢,机体抗体反应延迟,抗体产生量少。节瘤拟杆菌是通过IV型纤毛和细胞外蛋白酶而产生作用。但从腐蹄病发病症状看,节瘤拟杆菌所致疾病的严重程度不是相同的,据此节瘤拟杆菌被分为毒性、弱毒性和良性菌这种分类通过对该菌基因组毒性关联蛋白 Vap(Virulence-associated protein)区域和毒性相关位点 vrl(Virulence Related Locus)区域,发现其致病特点与基因的顺序有很大联系。因此快速检测节瘤拟杆菌具有重要意义。

因此快速检测节瘤拟杆菌具有重要意义。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节瘤拟杆菌的试剂盒,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,引物是根据节瘤拟杆菌高度保守区设计,不会跟其他病毒 DNA 发生交叉反应。

5. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。

规格及成分:

| 编号 | 成分 | 规格 |
|-----|---|-------------------|
| 试剂一 | 2 \times Probe qPCR MagicMix | 500 μ L (本色盖) |
| 试剂三 | 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 1mL (黄盖) |
| 试剂二 | 节瘤拟杆菌探针法 qPCR 引物混合液 | 100 μ L (白盖) |
| 试剂四 | 节瘤拟杆菌探针法 qPCR 探针 | 50 μ L (棕色管) |
| 试剂五 | 节瘤拟杆菌探针法 qPCR 阳性对照($1\times 10^8/\mu$ L) | 50 μ L (红盖) |
| | 使用手册 | 1 份 |

运输及保存:

低温运输, -20 $^{\circ}$ 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/ 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 7, 6, 5, 4, 3, 2。
2. 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)。
3. 在 7 号管中加入 5 μ L 1×10^8 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^7 拷贝/ μ 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 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 的标准曲线样品。放冰上待用。

- 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 拷贝/ μL 的标准曲线样品。
- 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：

- 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 μL 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。
- 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 μL 体系，在样品制备室进行)：

- 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。
- 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 μL | 10 μL | 各 10 μL |
| 节瘤拟杆菌探针法 qPCR 探针 | 1 μL | 1 μL | 各 1 μL |
| 节瘤拟杆菌 qPCR 引物混合液 | 2 μL | 2 μL | 各 2 μL |
| N+2 个待测 DNA 模板 | 7 μL | -- | -- |
| 超纯水 | -- | 7 μL | -- |
| 第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号) | -- | -- | 各 7 μL (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°C | 3 min |
| PCR 反应 40 个循环 | 95°C | 15 sec |
| | 60°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 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 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 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。若重复结果 Ct 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。