

# 丹毒丝菌属通用探针法 qPCR 试剂盒

Erysipelothrix spp. Probe PCR Kit

目录号: ml104277

## 使 用 说 明 书

### 产品及特点

本产品是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测丹毒丝菌的试剂盒。丹毒丝菌 (Erysipelothrix) 是一类革兰氏染色阳性菌，在自然界中广泛存在。丹毒丝菌属起的丹毒丝菌病是一种急性细菌性疾病，其病理特征为在感病动物皮肤上形成红色凸起的斑块。丹毒丝菌感染人和多种动物，严重影响人和动物健康，因此快速检测丹毒丝菌属具有重要意义。本产品具有下列特点：

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，灵敏度高，检测限可达 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据丹毒丝菌属基因组 DNA 高度保守区设计，不会跟其它生物的 DNA 发生

- 交叉反应。
5. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时，线性范围至少 5 个数量级。
6. 本产品足够 50 次 20  $\mu\text{L}$  体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
7. 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 $\mu\text{L}$ | 0.5mL 本色盖 |
| 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 |
| 丹毒丝菌属 qPCR 引物-探针干粉                                                      | 50 次              | 0.5mL 白盖管 |
| 丹毒丝菌属阳性对照( $1 \times 10^7$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ )                          | 50 $\mu\text{L}$  | 0.5mL 黄盖管 |
| 使用手册                                                                    | 1 份               | 无         |
| 本产品采用五孔盒包装                                                              |                   |           |
| <b>注 意：</b> 引物-探针干粉在使用前需要离心，然后在离心管中加入 165 mL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。 |                   |           |

## 使用方法

- 一、稀释标准曲线样品（以  $10^1$ - $10^6$  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。本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供 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. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu\text{L}$  荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头（下同）。
  3. 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(试剂盒提供)，充分震荡混匀 1 分钟，得到  $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。

4. 换枪头，在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡混匀 1 分钟，得到  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步所得)，充分震荡混匀 1 分钟，得到  $1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 依次重复上面的操作得到 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，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  $\mu\text{L}$  上步所得 4 号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样品 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 $\mu\text{L}$ 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加)：

| 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 Master Mix | 各 10 $\mu\text{L}$ | 10 $\mu\text{L}$ | 各 10 $\mu\text{L}$ |
| 丹毒丝菌属 qPCR 引物-探针混合液     | 3 $\mu\text{L}$    | 3 $\mu\text{L}$  | 3 $\mu\text{L}$    |

|       |                                                                                                                                                          |     |                                     |       |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------------------------------|-------|
|       | 待测样本 DNA 模板                                                                                                                                              | 7μL | 不加                                  | 不加    |
|       | 超纯水                                                                                                                                                      | 不加  | 7μL                                 | 不加    |
|       | 第 6 步所得标准曲线样品稀释液（1-6 号）                                                                                                                                  | 不加  | 不加                                  | 各 7μL |
|       | 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℃ | 5min                                |       |
|       | PCR 反应<br><br>(45 个循环)                                                                                                                                   | 95℃ | 15sec                               |       |
|       |                                                                                                                                                          | 60℃ | 1min<br><br>(采集 FAM 通道，淬灭基团为 TAMRA) |       |
|       | 四、数据处理                                                                                                                                                   |     |                                     |       |
|       | 12. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系，购买新的引物和探针。                        |     |                                     |       |
|       | 13. 如果阴性对照和阳性对照正常，则实验有效，可以进入后续分析。                                                                                                                        |     |                                     |       |
|       | 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，则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 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 40，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 40，则为阴性。如果 Ct 小于 40 则为阳性。 |     |                                     |       |
| 自备试剂  | 超纯水，样品 DNA。                                                                                                                                              |     |                                     |       |
| 运输及保存 | 低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。                                                                                                                                     |     |                                     |       |