



## 反刍兽曼氏杆菌染料法荧光定量 PCR 试剂盒

### 产品及特点:

1. 即开即用, 用户只需要提供病毒样品。
2. 根据反刍兽曼氏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 $\mu$ 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 $\mu$ L (棕色管) |
| 试剂二 | 荧光 PCR 专用模板稀释液                                 | 1 mL (黄盖)         |
| 试剂三 | 反刍兽曼氏杆菌染料法 PCR 引物混合液                           | 100 $\mu$ L (白盖)  |
| 试剂四 | 反刍兽曼氏杆菌染料法 PCR 阳性对照( $1\times 10^8$ / $\mu$ L) | 50 $\mu$ 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 $^{\circ}$ C保存, 有效期一年。

### 自备试剂:

DNA 模板、10 $\times$ 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 10E2-10E7 拷贝/ $\mu$ 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。
5. 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/ $\mu\text{L}$  的阳性对照。放冰上待用。
6. 换枪头，在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照到 5 号管中，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  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  $1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ，10 $\mu\text{L}$  相当于 1 万拷贝）或第 5 号（浓度为  $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ，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  $\mu$ 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<br>(2-7 管)                          |
|-----------------------------------|------------|------------|---|
| 2 $\times$ qPCR MagicMix<br>(棕色管) | 10 $\mu$ L | 10 $\mu$ L | 各 10 $\mu$ L                                  |
| 反刍兽曼氏杆菌 PCR 引<br>物混合液 (白盖)        | 2 $\mu$ L  | 2 $\mu$ L  | 各 2 $\mu$ L                                   |
| N+2 待测样品 DNA 模板                   | 6 $\mu$ L  | 不加         | 不加  |
| 自备 10 $\times$ ROX (见注)           | 2 $\mu$ L  | 2 $\mu$ L  | 各 2 $\mu$ L                                   |
| 第 7 步所得 PCR 阳性<br>对照稀释液(2-7 号)    | 不加         | 不加         | 各 6 $\mu$ L(2 号样到 2<br>号管, 3 号样到 3 号<br>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 $^{\circ}$ C | 5 分钟 |
| PCR 反应 30 个循环 | 94 $^{\circ}$ C | 60 秒 |
|               | 50 $^{\circ}$ C | 60 秒 |
|               | 72 $^{\circ}$ 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。

**上海纪宁实业有限公司([www.shjning.com](http://www.shjning.com))所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。**