



# 多杀巴斯德菌探针法 qPCR 试剂盒

*Pasteurella multocida* Probe qPCR Kit

仅

供

科

研

使

用

| 产品及特点                                                            | 多杀巴斯德菌 (Pasteurella multocida)是重要的人兽共患条件性致病菌，它是革兰氏阴性菌，属巴氏杆菌科巴氏杆菌属，可引起动物急性、败血性传染病，如禽霍乱、牛和兔出血性败血症、猪肺炎和猪萎缩性鼻炎，人也可以经过猫和狗咬伤后感染。因此快速检测多杀巴斯德菌具有重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测多杀巴斯德菌的试剂盒，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，分析灵敏性高，可以达到 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，引物是根据多杀巴斯德菌 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 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为 5 个数量级。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |       |           |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |     |     |           |                     |      |           |                                |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                  |  |  |
|                                                                  | 6. 本产品足够 50 次 20μL 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                                                            | <table><tr><th>成分</th><th>规格</th><th>包装</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>0.5mL</td><td>0.5mL 本色盖</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>1mL</td><td>1.5mL 绿盖管</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>1mL</td><td>1.5mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>多杀巴斯德菌 qPCR 引物-探针干粉</td><td>50 次</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr><tr><td>多杀巴斯德菌 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)</td><td>50μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>1 份</td><td>无</td></tr><tr><td colspan="3">本产品采用五孔盒包装</td></tr><tr><td colspan="3">注 意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 162uL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。</td></tr></table> |       |           | 成分 | 规格 | 包装 | 2×Probe qPCR MasterMix | 0.5mL | 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 | 多杀巴斯德菌 qPCR 引物-探针干粉 | 50 次 | 0.5mL 棕色管 | 多杀巴斯德菌 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL) | 50μL | 0.5mL 黄盖管 | 使用手册 | 1 份 | 无 | 本产品采用五孔盒包装 |  |  | 注 意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 162uL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。 |  |  |
|                                                                  | 成分                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 规格    | 包装        |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |     |     |           |                     |      |           |                                |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                  |  |  |
|                                                                  | 2×Probe qPCR MasterMix                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0.5mL | 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 |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |     |     |           |                     |      |           |                                |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                  |  |  |
|                                                                  | 多杀巴斯德菌 qPCR 引物-探针干粉                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 50 次  | 0.5mL 棕色管 |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |     |     |           |                     |      |           |                                |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                  |  |  |
|                                                                  | 多杀巴斯德菌 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 50μL  | 0.5mL 黄盖管 |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |     |     |           |                     |      |           |                                |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                  |  |  |
|                                                                  | 使用手册                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1 份   | 无         |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |     |     |           |                     |      |           |                                |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                  |  |  |
| 本产品采用五孔盒包装                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |       |           |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |     |     |           |                     |      |           |                                |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                  |  |  |
| 注 意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 162uL 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                                                             | <p><b>一、稀释标准曲线样品</b>（以 10E1-10E6 拷贝/μL 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。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |       |           |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |     |     |           |                     |      |           |                                |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                  |  |  |
|                                                                  | 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 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。
- 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 1 分钟, 得  $1\times 10^5$  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(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得  $1\times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
- 6. 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, 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核酸制备试剂盒所要求的起始样本体积一样, 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 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加) :

| 成分 | 样品管<br>N+2 个 | PCR<br>阴性对照 | 标准曲线样品管<br>(1-6 管) |
|----|--------------|-------------|--------------------|
|----|--------------|-------------|--------------------|

|                                                                                                                                                          | 2×Probe qPCR MasterMix                                                                                                                                                                                                                               | 各 10μL                               | 10μL  | 各 10μL |    |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-------|--------|----|----|----|-----|-----|------|--------------------|-----|-------|-----|--------------------------------------|
|                                                                                                                                                          | 多杀巴斯德菌 qPCR 引物-探针混合液                                                                                                                                                                                                                                 | 各 3μL                                | 3μL   | 各 3μL  |    |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
|                                                                                                                                                          | N+2 个待测 DNA 样本                                                                                                                                                                                                                                       | 各 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：                                                                                                                                                                                                                             |                                      |       |        |    |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
|                                                                                                                                                          | <table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>2min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应<br/>(45 个循环)</td><td>95℃</td><td>15sec</td></tr><tr><td>58℃</td><td>30sec（采集 FAM 通道的荧光信号，设置 BHQ-1 为淬灭基团）</td></tr></table> |                                      |       |        | 过程 | 温度 | 时间 | 预变性 | 95℃ | 2min | PCR 反应<br>(45 个循环) | 95℃ | 15sec | 58℃ | 30sec（采集 FAM 通道的荧光信号，设置 BHQ-1 为淬灭基团） |
|                                                                                                                                                          | 过程                                                                                                                                                                                                                                                   | 温度                                   | 时间    |        |    |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
|                                                                                                                                                          | 预变性                                                                                                                                                                                                                                                  | 95℃                                  | 2min  |        |    |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
|                                                                                                                                                          | PCR 反应<br>(45 个循环)                                                                                                                                                                                                                                   | 95℃                                  | 15sec |        |    |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
| 58℃                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                      | 30sec（采集 FAM 通道的荧光信号，设置 BHQ-1 为淬灭基团） |       |        |    |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
| 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 DNA 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。 |                                                                                                                                                                                                                                                      |                                      |       |        |    |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
| PCR 编号                                                                                                                                                   | TW-E10452                                                                                                                                                                                                                                            |                                      |       |        |    |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
| 说明书                                                                                                                                                      | 1 份                                                                                                                                                                                                                                                  |                                      |       |        |    |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
| 自备试剂                                                                                                                                                     | 样品 DNA。                                                                                                                                                                                                                                              |                                      |       |        |    |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
| 运输及保存                                                                                                                                                    | 低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。                                                                                                                                                                                                                                 |                                      |       |        |    |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |

**生产企业: 上海通蔚实业有限公司**

**公司地址: 上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603**

**公司电话: 021-54845833**

**技术支持: 15800441009**