



## 腐败希瓦菌探针法荧光定量 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，引物是根据腐败希瓦菌高度保守区设计，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 $\times$ Probe qPCR MagicMix                | 500 $\mu$ L(本色盖) |
| 试剂二  | 荧光 PCR 专用模板稀释液                                | 1mL(黄盖)          |
| 试剂三  | 腐败希瓦菌 qPCR 引物混合液                              | 100 $\mu$ L(白盖)  |
| 试剂四  | 腐败希瓦菌 qPCR 探针                                 | 50 $\mu$ L(棕色管)  |
| 试剂五  | 腐败希瓦菌探针法 qPCR 阳性对照( $1\times 10^8$ / $\mu$ L) | 50 $\mu$ 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 $10E2$ - $10E7$ 拷贝/ $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L  $1 \times 10E8$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E7$  拷贝/ $\mu$ 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  $\mu$ L  $1 \times 10E7$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu$ 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  $\mu$ L  $1 \times 10E6$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1 \times 10E5$  拷贝/ $\mu$ 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<br>样品管 | PCR 阴性对<br>照管 | 标准曲线样品<br>管(2-7 管)                           |
|-------------------------|--------------|---------------|----------------------------------------------|
| 2×Probe qPCR MagicMix   | 10μL         | 10μL          | 各 10μL                                       |
| 腐败希瓦菌 qPCR 探针           | 1μL          | 1μL           | 各 1μL                                        |
| 腐败希瓦菌探针法 qPCR 引物混合液     | 2μL          | 2μL           | 各 2μL                                        |
| N+2 个待测 DNA 模板          | 7μL          | --            | --                                           |
| 超纯水                     | --           | 7μL           | --                                           |
| 第 7 步所得标准曲线样品稀释液(2-7 号) | --           | --            | 各 7μL (2 号<br>样到 2 号管, 3<br>号样到 3 号<br>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℃ | 3 min                 |
| PCR 反应 40 个循环 | 95℃ | 15 sec                |
|               | 60℃ | 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。

**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。**