

【产品名称】

通用名称：嗜肺巴斯德杆菌探针法 qPCR 试剂盒

【产品编号】 AP9696

【包装规格】 50T/盒

【预期用途】

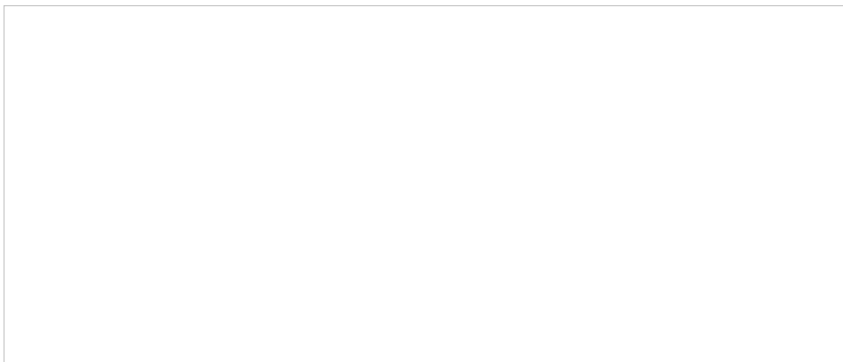
产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测嗜肺巴斯德杆菌的试剂盒。

【检验原理】

嗜肺巴斯德杆菌(*Pasteurella pneumophila*)在自然界中分布广泛，它有两种生物型，主要感染啮齿类动物，对实验小鼠、大鼠和豚鼠的危害较大。嗜肺巴斯德杆菌作为一种条件致病菌，能够引起免疫缺陷动物或免疫功能低下的动物产生严重的肺炎，并可能导致动物死亡。

本试剂盒根据探针法荧光定量 PCR 原理开发的嗜肺巴斯德杆菌检测试剂盒。本产品即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板。引物等组分经过优化，灵敏度高。提供阳性对照，便于区分假阴性样品。特异性高，引物是根据嗜肺巴斯德杆菌 DNA 序列高度保守区设计，不会跟其他病毒的 DNA 发生交叉反应。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。本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。本产品只能用于科研。

【试剂组成】



说明：不同批号的试剂盒组分不可交互使用。

【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。

【适用仪器】

ABI、安捷伦 MX3000P/3005P、LightCycler、Bio-Rad、eppendorf 等系

列荧光定量 PCR 检测仪。

【使用方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）

稀释标准曲线样品（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。

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，最好用带芯枪头，下同。
3. 在 6 号管中加入 $5\ \mu\text{L}\ 1\times 10E7$ 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 $1\times 10E6$ 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 $5\ \mu\text{L}\ 1\times 10E6$ 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1\times 10E5$ 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 $5\ \mu\text{L}\ 1\times 10E5$ 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1\times 10E4$ 拷贝/ μL 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。

2. 样本处理（样本处理区）

2.1 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 $10\ \mu\text{L}$ 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。

2.2 核酸提取：核酸提取可以采用上海抚生实业有限公司的核酸提取或纯化试剂，操作方法按照说明书进行。

3. 试剂配制(试剂准备区)

准备足量的 PCR 管(样品管、阴性对照管、阳性对照管)，向各 qPCR 管中分别加入下列成分：

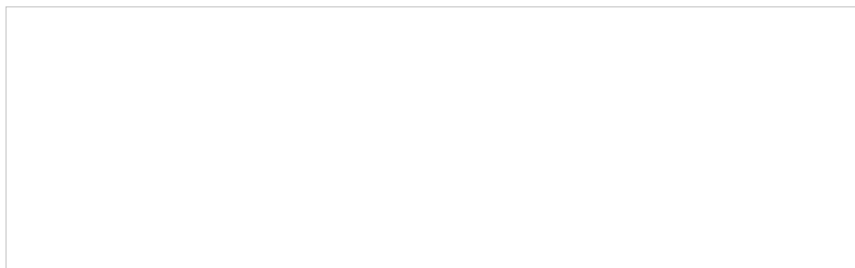
--

4. 添加模板(模板添加区)

向 qPCR 管中分别加入 5 uL 模板，顺序为阴性对照（DEPC-H₂O）、待测样品模板、嗜肺巴斯德杆菌 qPCR 阳性对照，离心 30 秒，立即进行扩增反应

5. 扩增反应(扩增及产物分析区):

将 qPCR 管放置在 qPCR 扩增仪器样品槽相应位置，进行扩增，扩增程序如下



【结果判定】

1. 如果制作标准曲线，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，推算出其浓度。

2. 如果未制作标准曲线，按照如下标准判定结果:

阳性对照（1×10⁵ 拷贝/μL）结果：Ct 值<30，有明显指数增长，呈典型的 S 型曲线。阴性对照结果：Ct 值>40 或无 Ct 值，无明显指数增长期和平台期。样本检测结果：Ct 值<38，有明显指数增长，表明样本中检测出嗜肺巴斯德杆菌，结果为阳性；Ct 值>40 或无 Ct 值，表明样本中未检测出嗜肺巴斯德杆菌，结果为阴性；Ct 值在 38-40 范围，应对样本进行复检，如重复实验结果 Ct 值仍在 38-40 范围，有明显指数增长，则判定为阳性，否则为阴性。

【注意事项】

1. PCR 操作各阶段应严格分区操作，避免交叉污染。
2. 试剂盒各组分使用前应充分融化混匀，离心数秒后使用。
3. 各组分不得与其他产品或不同批号的相应成分进行互换。
4. 待测标本若不及时检测，应保存于-20℃或-70℃。
5. 样品的处理应该严格按照生物安全规范操作。
6. PCR 操作人员应具有经验和受过专业培训。
7. 本试剂盒仅用于科研使用，不做为临床诊断使用。