

核
酸
扩
增
系
列

CAT#:14-11750
低温运输、-20℃保存

TIANDZ

副猪嗜血杆菌定量 PCR 试剂盒

Haemophilus parasuis Fluorescent PCR Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区学院南路 12 号北师大留学生创业园 57 号楼 301 室

QQ:944823743, 449730601 (销售), 948393554 (技术), www.tiandz.com

电话: 010-80638853, 010-62200278 (销售), 15811350851 (技术), order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>副猪嗜血杆菌(<i>Haemophilus parasuis</i>, HPS)属巴斯德氏菌科嗜血杆菌属, 是一种依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)且没有运动性的小型、多形性、革兰氏阴性杆菌。HPS 可引起猪多发性浆膜炎、关节炎, 严重时导致体温升高、呼吸困难甚至死亡, 给养猪业带来巨大的经济损失。目前对 HPS 的诊断主要是细菌分离培养和 PCR。HPS 培养需要 NAD、马血清和 5% CO₂ 环境, 需 24-36 小时, 还容易出现杂菌污染, 因此 PCR 是目前诊断 HPS 最常用的方法。本产品就是基于 PCR 的 HPS 检测试剂盒, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 灵敏度高, 分析灵敏度可以达到 50 拷贝/uL, 远高于细菌培养法。 2. 特异性高, 根据 HPS 的 16S rDNA 基因保守区设计引物, 可扩增出强、中和弱毒力的各种 HPS 血清型, 但不会误检猪链球菌 2 型、猪伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等常见无关细菌。 3. 一管封闭式, 避免了 PCR 产物对后续 PCR 的污染。 4. 线性范围广, 在 10-10⁷ 拷贝/uL 的靶分子浓度范围内均呈线性。 5. 简单快捷, 只需要 2 小时即可得到实验结果。 												
<p>规格及成分</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">成 份</th> <th style="text-align: center;">50 次塑料袋包装 (14-11750)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">即用型荧光 PCR Mix</td> <td style="text-align: center;">750 uL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">HPS 专一性引物对</td> <td style="text-align: center;">100 uL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">HPS 阳性对照</td> <td style="text-align: center;">50 uL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">超纯水</td> <td style="text-align: center;">1 mL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">使用手册</td> <td style="text-align: center;">1 份</td> </tr> </tbody> </table>	成 份	50 次塑料袋包装 (14-11750)	即用型荧光 PCR Mix	750 uL	HPS 专一性引物对	100 uL	HPS 阳性对照	50 uL	超纯水	1 mL	使用手册	1 份
成 份	50 次塑料袋包装 (14-11750)												
即用型荧光 PCR Mix	750 uL												
HPS 专一性引物对	100 uL												
HPS 阳性对照	50 uL												
超纯水	1 mL												
使用手册	1 份												
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输、-20℃保存, 有效期一年。</p>												
<p>自备试剂</p>	<p>样品。</p>												
<p>使用方法</p>	<p>一、样品 DNA 的制备</p> <p>用自选方法纯化 HPS 样品的 DNA, 也可以另购本公司的细菌 DNAout 或柱式细菌 DNAout, 上述两款产品跟本试剂盒兼容。</p> <p>二、制备 HPS 标准曲线</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 标记 6 个离心管, 分别为 1,2,3,4,5 和 6 号。 2. 用带芯分别加入 45 uL 超纯水 (最好用带芯枪头, 下同)。 3. 在 1 号管中加入 5 uL HPS 阳性对照(本试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟。 4. 换枪头, 从 1 号管中取 5 uL 溶液到 2 号管中, 充分震荡 1 分钟。 5. 换枪头, 从 2 号管中取 5 uL 溶液到 3 号管中, 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的样品。 												

6. 从 6 个管中分别取 5 uL 进行定量 PCR (见下步), 每个样品最好重复 3 次。

三、荧光定量 PCR 反应 (30 uL 体系)

7. 在 PCR 管中加入下列成分 (每个样品最好重复三次, 这里只列出一次):

成 份	样 品	6 个阳性对照 (见制备 HPS 标准曲线)	阴性对照
HPS 专一性引物对	2 uL	2 uL	2 uL
样品 DNA	5 uL	无	无
HPS 阳性对照	无	5 uL (每个管加一个稀释度的对照)	无
自备 1×ROX (见注)	2 uL	2 uL	2 uL
补超纯水到	15 uL	15 uL	15 uL
即用型荧光 PCR Mix	15 uL	15 uL	15 uL

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、RotorGene 3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480) 不需要使用 ROX。此处阴性对照用的是水, 用户也可以用其他大肠杆菌基因组 DNA 做阴性对照。

8. 轻柔混匀后上机, 按下面参数进行定量 PCR, 反应参数如下:

过程	温度	时间	其他
预变性	95°C	5 分钟	
	95°C	20 s	
	62°C	20 s	收集荧光数据, 选择波长见注。
PCR 反应 (40-50 个循环)	62°C	20 s	
	68°C	20 s	
溶解曲线分析判断产物特异性	加热到 95°C 10 分钟, 然后降低到 55°C 后, 按 0.5°C/10s 的升幅将温度提高到 95°C, 其间记录下荧光信号的变化。特异的 HPS PCR 扩增产物将在 84.5°C 产生特异峰。		

注: 本产品所用荧光染料跟 DNA 结合时的最大光吸收是 500 nm, 最大发射波长是 530 nm, 不能 DNA 结合时最大吸收波长是 471 nm, 无发射。

四、数据处理

9. 以 HPS 阳性对照浓度的 log 值为横轴, 以 Ct 值为纵轴, 绘制标准曲线。本试剂盒提供的阳性对照浓度为 XXX 拷贝/uL, 所以 1-6 管中的稀释样品浓度可以由此计算出来。再用浓度的 log 为横轴, 以 Ct 值为纵轴, 通过待测样品的 Ct 值反推出样品 DNA 的浓度。

	<p>10. 如果没有自己做标准曲线，可以用本试剂的经验标准曲线方程： $Ct = -3.4 \log X + 25.4$，用户将样品所测 Ct 值放入方程式即可计算出 X (样品 DNA 浓度)。此法不是非常准确，因为仪器型号，试剂，操作误差等都会影响结果。</p>
关联产品	犬瘟热细菌 RT-PCR 试剂盒 (CAT#: 11-CDV-50)。