

布鲁氏杆菌属通用探针法荧光定量 PCR 试剂盒

Brucella spp. Probe qPCR Kit

CAT#: BN61490

低温运输, -20℃保存

产品及特点	布鲁氏杆菌（Brucella spp.）是一种细胞内寄生小球杆状菌，革兰氏染色阴性，主要感染动物，牛、羊、猪、狗以及骆驼、鹿等动物，主要是通过接触感染的动物或者吃被感染的食物以及实验室接触等方式传播给人类。能引起人和多种动物的急性和慢急性疾病，被感染的人和动物表现为流产及不孕不育等症状，因此布鲁氏杆菌属的快速准确鉴定对该病的预防和检疫有着重要作用，本产品就是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测布鲁氏杆菌属的通用试剂盒。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，灵敏度高，可达到 70 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，引物是根据布鲁氏杆菌属高度保守区设计，不会跟其他病原菌 DNA 发生交叉反应。 5. 本产品足够 50 次 20 μ 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	本产品采用五孔盒包装 <table><tr><td>成分</td><td>编号</td><td>规格</td><td>包装</td></tr><tr><td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>60001</td><td>0.5 mL</td><td>0.5mL</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>60002</td><td>1 mL</td><td>1.5mL</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>60003</td><td>1 mL</td><td>1.5mL</td></tr><tr><td>布鲁氏杆菌属通用 qPCR 引物-探针干粉</td><td>61490-4</td><td>150 μ L</td><td>0.5mL</td></tr><tr><td>布鲁氏杆菌属 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/ μ L)</td><td>61490-5</td><td>50 μ L</td><td>0.5mL</td></tr><tr><td>使用手册</td><td></td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table> 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	编号	规格	包装	2×Probe qPCR MasterMix	60001	0.5 mL	0.5mL	荧光 PCR 专用模板稀释液	60002	1 mL	1.5mL	超纯水	60003	1 mL	1.5mL	布鲁氏杆菌属通用 qPCR 引物-探针干粉	61490-4	150 μ L	0.5mL	布鲁氏杆菌属 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/ μ L)	61490-5	50 μ L	0.5mL	使用手册		1 份	无
成分	编号	规格	包装																										
2×Probe qPCR MasterMix	60001	0.5 mL	0.5mL																										
荧光 PCR 专用模板稀释液	60002	1 mL	1.5mL																										
超纯水	60003	1 mL	1.5mL																										
布鲁氏杆菌属通用 qPCR 引物-探针干粉	61490-4	150 μ L	0.5mL																										
布鲁氏杆菌属 qPCR 阳性对照 (1×10E7 拷贝/ μ L)	61490-5	50 μ L	0.5mL																										
使用手册		1 份	无																										

本产品仅用于科研

运输及保存	低温运输，-20℃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 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 μL 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 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 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 μL 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 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 μL 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E4 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。 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 μL 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 μL 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。

1. 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）：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性 对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
布鲁氏杆菌属 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加
超纯水	不加	7 μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀 释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7 μL (2 号样 到 2 号管, 3 号样 到 3 号管…)

2. 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℃	2 min
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec
	58℃	30 sec (采集 FAM 通道的荧光 信号, 设置 BHQ-1 为淬灭基团)

四、数据处理

3. 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。
4. 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 45。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 40。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 45 则为阴性，如

	果小于或等于 40 则为阳性。如果在 40-45 之间，则重复一次。若重复结果 Ct 值小于 45，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。
关联产品	布鲁氏杆菌属通用可视化 LAMP 检测试剂盒