维容氏支原体探针法qPCR试剂盒（不含内参）

Mycoplasma wenyonii Probe qPCR Kit

CAT#: BN62243
低温运输，-20℃保存

产品及特点

维容氏支原体(*Mycoplasma wenyonii*)是引起牛嗜血支原体病的主要病之一，多引起牛贫血、黄疸、发热和消瘦等症状，对养牛业造成一定的危害，因此快速检测维容氏支原体具有重要的意义。为此，本公司以探针法qPCR技术为基础开发了维容氏支原体的检测试剂盒，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，分析灵敏度高，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，引物是根据维容氏支原体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。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20 μL体系的探针法qPCR反应。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	60001	0.5 mL	0.5 mL
荧光PCR专用模板稀释液	60002	1 mL	1.5 mL
超纯水	60003	1 mL	1.5 mL
维容氏支原体 qPCR引物-探针干粉	62243-4	50次	0.5 mL
维容氏支原体qPCR 阳性对照(1E7拷贝/μL)	62243-5	50 μL	0.5 mL
使用手册		1份	1份

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165 μL的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。

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，超纯水，核酸纯化试剂盒。

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以1E1-1E6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 1E7拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得1E6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 1E6拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1E5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 1E5拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1E4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上步所得第4号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次样本制备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。
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
维容氏支原体 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…）

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行qPCR:

过程	温度	时间
预变性	95℃	10 min.
PCR反应 （45个循环）	95℃	15 sec.
	60℃	30 sec（采集FAM通道的荧光信号，淬灭基团为TAMRA）

四、数据处理

12. 如果样本制备阳性对照或PCR阳性对照(包括标曲样本)结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据，需要重新样本制备，重新进行PCR扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或PCR阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系。
13. 如果阴性对照和阳性对照均正常，则实验有效，可以进入后续分析。
14. 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。
15. 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必须没有读数，或者大于或等于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。对待测样品，如果其Ct没有读数、大于或等于40则均为阴性，如果小于40则为阳性。