



## 猪鼻支原体探针法 qPCR 试剂盒

**Mycoplasma hyorhinis Probe qPCR Kit**

货号: JLC\_Y7628

使

用

说

明

书

| 产品及特点                                                                   | <p>猪鼻支原体（Mycoplasma hyorhinis）是 Mycoplasma 属的微生物，主要引起猪鼻支原体病，</p> <p>又称格拉斯病,是一种支原体性传染病,其发病特征是多发性浆膜炎和关节炎。因此快速检测猪鼻支原体具有重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测猪鼻支原体的试剂盒，<b>它具有下列特点：</b></p> <p>1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板。</p> <p>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。</p> <p>3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。</p> <p>4. 特异性高，引物是根据猪鼻支原体 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。</p> <p>5. 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。</p> <p>6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。</p> <p>7. 本产品只能用于科研。</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |       |           |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |                 |      |           |                    |      |           |                            |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----------|----|----|----|------------------------|-------|-----------|----------------|-----|-----------|-----------------|------|-----------|--------------------|------|-----------|----------------------------|------|-----------|------|-----|---|------------|--|--|-------------------------------------------------------------------------|--|--|
|                                                                         | 规格及成分                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <table><tr><th>成分</th><th>规格</th><th>包装</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>0.5mL</td><td>0.5mL 本色盖</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>1mL</td><td>1.5mL 绿盖管</td></tr><tr><td>探针法 qPCR 特异性增强剂</td><td>50μL</td><td>1.5mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>猪鼻支原体 qPCR 引物-探针干粉</td><td>50 次</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr><tr><td>猪鼻支原体 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)</td><td>50μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>1 份</td><td>无</td></tr><tr><td colspan="3">本产品采用五孔盒包装</td></tr><tr><td colspan="3"><b>注 意：</b>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 162μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。</td></tr></table> |       |           | 成分 | 规格 | 包装 | 2×Probe qPCR MasterMix | 0.5mL | 0.5mL 本色盖 | 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 1mL | 1.5mL 绿盖管 | 探针法 qPCR 特异性增强剂 | 50μL | 1.5mL 蓝盖管 | 猪鼻支原体 qPCR 引物-探针干粉 | 50 次 | 0.5mL 棕色管 | 猪鼻支原体 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL) | 50μL | 0.5mL 黄盖管 | 使用手册 | 1 份 | 无 | 本产品采用五孔盒包装 |  |  | <b>注 意：</b> 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 162μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。 |  |  |
|                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 成分                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 规格    | 包装        |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |                 |      |           |                    |      |           |                            |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |
|                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 2×Probe qPCR MasterMix                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 0.5mL | 0.5mL 本色盖 |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |                 |      |           |                    |      |           |                            |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |
|                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 荧光 PCR 专用模板稀释液                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1mL   | 1.5mL 绿盖管 |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |                 |      |           |                    |      |           |                            |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |
|                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 探针法 qPCR 特异性增强剂                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 50μL  | 1.5mL 蓝盖管 |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |                 |      |           |                    |      |           |                            |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |
|                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 猪鼻支原体 qPCR 引物-探针干粉                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 50 次  | 0.5mL 棕色管 |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |                 |      |           |                    |      |           |                            |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |
|                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 猪鼻支原体 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 50μL  | 0.5mL 黄盖管 |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |                 |      |           |                    |      |           |                            |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |
| 使用手册                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 1 份                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 无     |           |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |                 |      |           |                    |      |           |                            |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |
| 本产品采用五孔盒包装                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |       |           |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |                 |      |           |                    |      |           |                            |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |
| <b>注 意：</b> 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 162μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |       |           |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |                 |      |           |                    |      |           |                            |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |
| 使用方法                                                                    | <p><b>一、稀释标准曲线样品</b>（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。</p> <p>1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |       |           |    |    |    |                        |       |           |                |     |           |                 |      |           |                    |      |           |                            |      |           |      |     |   |            |  |  |                                                                         |  |  |

2. 用带芯枪头分别加入 45  $\mu\text{L}$  荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头，下同）。
3. 在 6 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E7 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E6 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E5 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5  $\mu\text{L}$  1E5 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E4 拷贝/ $\mu\text{L}$  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，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。
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  $\mu\text{L}$  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（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 $\mu\text{L}$ | 10 $\mu\text{L}$ | 各 10 $\mu\text{L}$ |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 猪鼻支原体 qPCR 引物-探针混合液      | 各 3μL                                | 3μL | 各 3μL |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|-----|-------|----|----|-----|-----|------|--------------------|-----|-------|-----|--------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 探针法 qPCR 特异性增强剂          | 1μL                                  | 1μL | 1μL   |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | N+2 个待测 DNA 样本           | 6μL                                  | -   | -     |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 超纯水                      | -                                    | 6μL | 不加    |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 第 6 步所得标准曲线样品稀释液（1-6 号）  | -                                    | -   | 各 6μL |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR： |                                      |     |       |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
| <table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>5min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应<br/>(40 个循环)</td><td>95℃</td><td>15sec</td></tr><tr><td>55℃</td><td>60sec（采集 FAM 通道的荧光信号，设置 TAMRA 为淬灭基团）</td></tr></table>                                                                                                                                                                                                                    |                          |                                      |     | 过程    | 温度 | 时间 | 预变性 | 95℃ | 5min | PCR 反应<br>(40 个循环) | 95℃ | 15sec | 55℃ | 60sec（采集 FAM 通道的荧光信号，设置 TAMRA 为淬灭基团） |
| 过程                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 温度                       | 时间                                   |     |       |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
| 预变性                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 95℃                      | 5min                                 |     |       |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
| PCR 反应<br>(40 个循环)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 95℃                      | 15sec                                |     |       |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 55℃                      | 60sec（采集 FAM 通道的荧光信号，设置 TAMRA 为淬灭基团） |     |       |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
| 四、数据处理                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                          |                                      |     |       |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
| <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>15. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 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，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 40，则为阴性。如果 Ct 小于 40 则为阳性。</p> |                          |                                      |     |       |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |
| 自备试剂                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 样品 DNA。                  |                                      |     |       |    |    |     |     |      |                    |     |       |     |                                      |

|              |                      |
|--------------|----------------------|
| <b>运输及保存</b> | 低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。 |
|--------------|----------------------|

**生产企业：上海机纯实业有限公司**

**公司地址：上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603**

**公司电话：021-54720761**

**技术支持：13166274223**