

镰刀菌通用电泳法 PCR 试剂盒

Fusarium spp. PCR Kit

使用手册 V1.0

产品及特点	镰刀菌 (<i>Fusarium spp.</i>) 是一类世界性分布的真菌，它不仅可以在土壤中越冬越夏，还可侵染多种植物(粮食作物、经济作物、药用植物及观赏植物)，引起植物的根腐、茎腐、茎基腐、花腐和穗腐等多种病害，寄主植物达 100 余种，侵染寄主植物维管束系统，破坏植物的输导组织维管束，并在生长发育代谢过程中产生毒素危害作物，造成作物萎蔫死亡，影响产量和品质，是生产上防治最艰难的重要病害之一。因此灵敏快捷地检测镰刀菌具有重要的意义。本产品就是为满足此需求而开发的、专门检测镰刀菌的 PCR 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. 产品经过精心优化，分析灵敏性能到达 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，引物是根据镰刀菌 DNA 高度保守区设计，<i>in silico</i> 分析发现它能检测镰刀菌，不会跟除此之外的其他生物的 DNA 发生交叉反应。 5. 本产品足够 50 次 20μL 体系的常规 PCR 反应。 6. 本产品只能用于定性实验，不能用于定量实验。 7. 本产品只能用于科研。																								
规格及成分	本产品采用 5 孔盒包装 <table><tr><th>成 份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>2×PCR MasterMix</td><td>990805</td><td>-0.5 mL</td><td>0.5 mL 本色盖</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>210806</td><td>1 mL</td><td>1.5 mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>镰刀菌通用 PCR 引物混合液</td><td>yw13-34700</td><td>100 μL</td><td>0.5mL 白盖管</td></tr><tr><td>镰刀菌通用 PCR 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)</td><td>Pc34700</td><td>250 μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>13-34700sc</td><td>1 份</td><td>1 份</td></tr></table> 注：为避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供专一	成 份	编号	规格	包装材料	2×PCR MasterMix	990805	-0.5 mL	0.5 mL 本色盖	超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管	镰刀菌通用 PCR 引物混合液	yw13-34700	100 μL	0.5mL 白盖管	镰刀菌通用 PCR 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	Pc34700	250 μL	0.5mL 黄盖管	使用手册	13-34700sc	1 份	1 份
成 份	编号	规格	包装材料																						
2×PCR MasterMix	990805	-0.5 mL	0.5 mL 本色盖																						
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管																						
镰刀菌通用 PCR 引物混合液	yw13-34700	100 μL	0.5mL 白盖管																						
镰刀菌通用 PCR 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	Pc34700	250 μL	0.5mL 黄盖管																						
使用手册	13-34700sc	1 份	1 份																						

	的 DNA 片段作为阳性对照。																								
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、样品 DNA 的制备 1. 如果有 N 个样品，必须设置 N+2 个提取反应，多出的两个中一个是 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用试剂盒提供的 PCR 阳性对照（1×10E4 拷贝/μL，本试剂盒提供）10μL 加上一定量的水作为制备的阳性对照（加水后其总体积跟核酸制备试剂盒所要求的起始样品体积一样）。可以直接用水作为制备的阴性对照。 2. 用自选方法纯化上述 N+2 个样品的 DNA。本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选用本公司的相关的核酸提取试剂盒。 二、设置 PCR 反应（20μL 体系） 3. 标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 DNA 样品，额外增加的两个管一个用于 PCR 阳性对照，另一个用于 PCR 阴性对照。按照下表在各 PCR 管中加入下列成分： <table><tr><th>成份</th><th>N+2 个 样品管</th><th>PCR 阴性对照</th><th>PCR 阳性对照</th></tr><tr><td>2×PCR MasterMix</td><td>各 10 μL</td><td>10 μL</td><td>10 μL</td></tr><tr><td>镰刀菌通用 PCR 引物混合液</td><td>各 2 μL</td><td>2 μL</td><td>2 μL</td></tr><tr><td>制备的 N+2 个 DNA 样品</td><td>各 8 μL</td><td>不加</td><td>不加</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>不加</td><td>8 μL</td><td>不加</td></tr><tr><td>镰刀菌通用 PCR 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)</td><td>不加</td><td>不加</td><td>8 μL</td></tr></table>	成份	N+2 个 样品管	PCR 阴性对照	PCR 阳性对照	2×PCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	镰刀菌通用 PCR 引物混合液	各 2 μL	2 μL	2 μL	制备的 N+2 个 DNA 样品	各 8 μL	不加	不加	超纯水	不加	8 μL	不加	镰刀菌通用 PCR 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	不加	不加	8 μL
成份	N+2 个 样品管	PCR 阴性对照	PCR 阳性对照																						
2×PCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL																						
镰刀菌通用 PCR 引物混合液	各 2 μL	2 μL	2 μL																						
制备的 N+2 个 DNA 样品	各 8 μL	不加	不加																						
超纯水	不加	8 μL	不加																						
镰刀菌通用 PCR 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	不加	不加	8 μL																						

	4. 上机进行 PCR，PCR 反应参数为:	<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>5 分钟</td></tr><tr><td rowspan="3">PCR 反应 (30 个循环)</td><td>95℃</td><td>15 秒</td></tr><tr><td>55℃</td><td>60 秒</td></tr><tr><td>65℃</td><td>60 秒</td></tr><tr><td>延伸</td><td>72℃</td><td>10 分钟</td></tr></table>	过程	温度	时间	预变性	95℃	5 分钟	PCR 反应 (30 个循环)	95℃	15 秒	55℃	60 秒	65℃	60 秒	延伸	72℃	10 分钟
	过程	温度	时间															
	预变性	95℃	5 分钟															
	PCR 反应 (30 个循环)	95℃	15 秒															
		55℃	60 秒															
		65℃	60 秒															
	延伸	72℃	10 分钟															
	三、电泳分析																	
	5. 取 10μL 扩增产物进行常规琼脂糖电泳，检测扩增效果，由于扩增产物较短，建议用 1.5%-2.0%的琼脂糖凝胶。																	
	6. 阳性样品预期得到的扩增产物长度为 110bp。如果两个阴性对照（样品制备阴性对照或 PCR 阴性对照）有此扩增产物，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析实验结果。如果所有样品和 PCR 阳性对照均无此扩增产物，则说明有系统性的问题（试剂，设备，程序，操作等），需要重复并排查原因。																	
7. 如果没有上述两种情况，则实验有效，可以分析样品的扩增结果。N+2 个样品中扩增产物的判断为阳性，无则判定为阴性。																		
关联产品	镰刀菌通用荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒																	