

托拉斯假单胞菌 PCR 检测试剂盒

Pseudomonas tolaasii PCR Kit

使用手册 V1.0

产品及特点	托拉斯假单胞杆菌 (<i>Pseudomonas tolaasii</i>)既能引起平菇菌盖出现凹陷型黄褐色病斑，也能引起子实体蜷缩，严重危害平菇的生产，因此快速检测托拉斯假单胞杆菌具有重要的意义。本产品就是为满足此需求而开发的、专门检测托拉斯假单胞菌的 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 1000 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，引物是根据托拉斯假单胞菌 DNA 高度保守区设计，<i>in silico</i> 分析发现它只能检测托拉斯假单胞菌，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	<table><tr><th>成 份</th><th>编 号</th><th>五孔盒包装</th></tr><tr><td>PCR MagicMix 3.0</td><td>90805</td><td>0.5 mL（本色盖）</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>210806</td><td>1 mL（蓝盖管）</td></tr><tr><td>托拉斯假单胞菌 PCR 引物混合液</td><td>yw13-4090hi</td><td>100 μL（白盖管）</td></tr><tr><td>托拉斯假单胞菌 PCR 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)</td><td>Pc13-4090hi-AF291753.1</td><td>250 μL（黄盖管）</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>13-4090sc</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，只提供专一的 DNA 片段作为阳性对照。			成 份	编 号	五孔盒包装	PCR MagicMix 3.0	90805	0.5 mL（本色盖）	超纯水	210806	1 mL（蓝盖管）	托拉斯假单胞菌 PCR 引物混合液	yw13-4090hi	100 μL（白盖管）	托拉斯假单胞菌 PCR 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	Pc13-4090hi-AF291753.1	250 μL（黄盖管）	使用手册	13-4090sc	1 份
成 份	编 号	五孔盒包装																			
PCR MagicMix 3.0	90805	0.5 mL（本色盖）																			
超纯水	210806	1 mL（蓝盖管）																			
托拉斯假单胞菌 PCR 引物混合液	yw13-4090hi	100 μL（白盖管）																			
托拉斯假单胞菌 PCR 阳性对照 (1×10E4 拷贝/μL)	Pc13-4090hi-AF291753.1	250 μL（黄盖管）																			
使用手册	13-4090sc	1 份																			
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（ 1×10^4 拷贝/ μL ，本试剂盒提供）加上一定量的水作为制备的阳性对照。加水后其总体积跟样品体积一样，样品体积多少取决于所用核酸纯化试剂盒的要求，试剂盒不同，所要求的起始样品体积可能不同。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（20 μL 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：

成份	N+2 个 样品管	PCR 阴性对照	PCR 阳性对照
PCR MagicMix 3.0	各 10 μL	10 μL	10 μL
托拉斯假单胞菌 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
托拉斯假单胞菌 PCR 阳性对照 (1×10^4 拷贝/ μL)	不加	不加	8 μL

4. 上机进行 PCR，PCR 反应参数为:

过程	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	5 分钟

	PCR 反应 (30 个循环)	95℃	1 分钟
		63℃	1 分钟
		72℃	2 分钟
		延伸	72℃
	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%的琼脂糖凝胶。		
6.	阳性样品预期得到的扩增产物长度为 450bp。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 个样品中有扩增产物的判断为阳性，无则判定为阴性。		
关联产品	托拉斯假单胞菌荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒		