|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:14-4400****低温运输，-20℃保存** |  |
| **柑橘顽固病螺原体染料法qPCR试剂盒*****Spiroplasma citri* SYBR qPCR Kit** |
| **使用手册V1.0** |
| **江苏天净沙基因诊断技术有限公司****网址：[www.bingene.com](http://www.bingene.com)；电话：400-6005850；电邮：order@bingene.com** |
| **产品及特点** | 橘顽固病螺原体（*Spiroplasma citri*）引起柑橘顽固病，该病是柑橘生产上一种严重的病害。在炎热的气候条件下，病害能大大降低果实的产量和质量。病原体主要侵染寄主韧皮部的筛管组织，存活在柑橘及其他寄主的体内，而不腐生在植株表面，是一种专性寄生物。病原体持久侵染植株，直到植株衰退。由于病原能通过昆虫介体传播，还能通过苗木和接穗传播，因此顽固病的防治很困难。因此快速灵敏检测柑橘顽固病螺原体具有重要意义。本公司开发的柑橘顽固病螺原体染料法qPCR试剂盒具有下列特点：1. 即开即用，用户只需要提供DNA模板。
2. 引物根据柑橘顽固病螺原体专一区设计，特异性高。
3. 分析灵敏度一般在1000拷贝/反应。
4. 荧光定量PCR检测，比常规PCR更加灵敏。
5. 一管式闭管操作，降低了交叉污染。
6. 本产品既可以定性，又可以定量。定量时线性范围至少有5个数量级。
7. 本试剂盒足够50次20μL反应体系的荧光定量PCR。
8. 本产品只适用于科研。
 |
| **规格及成分** |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 成分 | 编号 | 五孔盒包装 |
| 2×SYBR qPCRMasterMix | 990408 | 500μL（本色管） |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 180701 | 1mL（绿盖管） |
| 柑橘顽固病螺原体染料法qPCR引物混合液 | yw14-4400 | 100μL（白盖管） |
| 柑橘顽固病螺原体染料法qPCR阳性对照(1×10E7拷贝/μL) | pc60908-4400 | 50μL（黄盖管） |
| 使用手册 | 14-4400sc | 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** | DNA模板、超纯水（根据机型决定，具体见使用方法）。 |
| **使用方法** | **一、稀释PCR阳性对照**（以10E1-10E6拷贝/μL这6个10倍稀释度为例）注意：由于阳性对照浓度非常高，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，只提供可以直接使用的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45μL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5μL1×10E7拷贝/μL的阳性对照，充分震荡1分钟，得1×10E6拷贝/μL的阳性对照。放冰上待用。
4. 换枪头，在5号管中加入5μL1×10E6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的阳性对照。放冰上待用。
5. 换枪头，在4号管中加入5μL1×10E5拷贝/μL的阳性对照到5号管中，充分震荡1分钟，得1×10E4拷贝/μL的阳性对照。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到6个稀释度的阳性对照。放冰上用。

**二、样品DNA的制备**1. 如果有N个样品，必须设置N+2个提取，多出的一个是样品制备PC（样品制备阳性对照），一个是样品制备NC（样品制备阴性对照）。可以用10μL上面第6步稀释得1×10E4拷贝/μL模板替代，用水补助体积，样品体积多少取决于所用核酸纯化试剂盒对起始样品的要求。可以用水作为制备阴性对照。
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核酸提取试剂盒兼容。制备所得为样品DNA溶液。

**三、设置qPCR反应（20μL体系，在样品制备室进行）**1. 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，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（用浓度为10E4拷贝/μL的阳性对照做模板）。下面只描述定量分析的步骤，定性分析只是把6个标曲反应缩减成1个，其余不变。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****对照管** | **PCR阳性****对照管（1-6管）** |
| 2×qPCR MagicMix | 10μL | 10μL | 各10μL |
| 柑橘顽固病螺原体染料法qPCR引物混合液 | 2μL | 2μL | 各2μL |
| N+2待测样品DNA模板 | 8μL | - | - |
| 自备超纯水 | - | 8μL | - |
| 第6步所得PCR阳性对照稀释液（1-6号） | - | - | 各8μL（2号样到2号 管， 3号样到3号管…） |

1. 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℃ | 3 min |
| PCR反应（35个循环） | 95℃ | 15 sec |
| 60℃ | 1 min（采集SYBR通道的荧光信号） |
| 按所用仪器的要求溶解曲线分析 |

**四、数据处理**1. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有Ct值，但Tm值跟阳性对照Tm不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，数据无效，不予以分析。Tm跟阳性对照Tm一致的，为有效Ct。
2. 如果两种阴性对照的溶解曲线所得Tm值跟阳性对照的Tm值一样，说明环境或试剂可能有过去的PCR扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。
3. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和PCR阴性对照）是假阳性，可以继续分析其它样品有效数据。
4. 对定量检测，以阳性对照样品的浓度的log值为横轴，以有效Ct值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效Ct值从标准曲线上推算出样品DNA浓度的log值，再换算出待测样品的DNA浓度。
5. 对定性检测，则有有效Ct值的为阳性，无有效Ct值的为阴性。
 |
| **关联产品** | 柑橘顽固病螺原体探针法荧光定量PCR试剂盒 |

220315dx