天
净
沙
系
列

CAT#:14-4400
低温运输, -20℃保存

BINGENE

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; 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 20 μ L 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 $\times$ SYBR qPCR Master Mix	990408	500 μ L (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	100 μ L (白盖管)
柑橘顽固病螺原体染料法 qPCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E7 拷贝/ μ L)	pc60908-4400	50 μ L (黄盖管)
使用手册	14-4400sc	1 份

运输及保存

低温运输, -20 $^{\circ}$ C 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/ μ L 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 45 μ L 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 μ L 1 $\times$ 10E7 拷贝/ μ L 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 5μL 1×10E6 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 5μL 1×10E5 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

7. 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。
8. 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)

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，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...)

10. 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

11. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有 Ct 值，但 T_m 值跟阳性对照 T_m 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。T_m 跟阳性对照 T_m 一致的，为有效 Ct。
12. 如果两种阴性对照的溶解曲线所得 T_m 值跟阳性对照的 T_m 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。
13. 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。
14. 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。
15. 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