

天
净
沙
系
列

CAT#:15-1010

低温运输, -20℃保存

BINGENE

瓜类细菌性果斑病菌探针法 qPCR 试剂盒

Acidovorax avenae ssp. citrulli Probe 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: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	瓜类细菌性果斑病菌 (<i>Acidovorax avenae subsp. citrulli</i>) 引起瓜类细菌性果斑病, 该病是葫芦科植物上的一种严重的世界性病害。瓜类细菌性果斑病菌可以侵染多种葫芦科作物, 如西瓜、甜瓜、南瓜、黄瓜等, 自报道以来已在美国、澳大利亚、巴西、土耳其、日本、泰国、以色列、伊朗、匈牙利、希腊和我国多个省份发生, 给当地的西甜瓜种植业造成了严重的损失。瓜类细菌性果斑病菌菌体短杆状, 革兰氏染色阴性, 不产生荧光, 严格好氧, 单根极生鞭毛。能在 41℃ 下生长, 不能在 4℃ 下生长。在 KB 培养基上呈现乳白色、圆形、光滑、全缘、隆起、不透明菌落, 菌落直径 1~2mm。由于瓜类细菌性果斑病具有发病迅速、传播速度快、爆发性强等特点, 使得该病害已成为影响我国瓜类生产的主要病害之一。因此, 快速对其进行诊断具有十分重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测瓜类细菌性果斑病菌的试剂盒, 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. 引物和探针经过优化, 分析灵敏性高, 可以达到 100 拷贝/μL。 3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。 4. 特异性高, 引物是根据瓜类细菌性果斑病菌 DNA 高度保守区设计, 不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。 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。 6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。 7. 本产品只能用于科研。																															
规格及成分	本产品采用五孔盒包装 <table><tr><th>成分</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>2×Probe qPCR MasterMix</td><td>981201</td><td>0.5 mL</td><td>0.5mL 本色盖</td></tr><tr><td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>180701</td><td>1 mL</td><td>1.5mL 绿盖管</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>210806</td><td>1 mL</td><td>1.5mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>瓜类细菌性果斑病菌 qPCR 引物-探针混合液</td><td>yp15-1010</td><td>150 μL</td><td>0.5mL 棕色管</td></tr><tr><td>瓜类细菌性果斑病菌 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)</td><td>Pc1010</td><td>50 μL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>15-1010sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>				成分	编号	规格	包装材料	2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5mL 本色盖	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5mL 绿盖管	超纯水	210806	1 mL	1.5mL 蓝盖管	瓜类细菌性果斑病菌 qPCR 引物-探针混合液	yp15-1010	150 μL	0.5mL 棕色管	瓜类细菌性果斑病菌 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	Pc1010	50 μL	0.5mL 黄盖管	使用手册	15-1010sc	1 份	无
成分	编号	规格	包装材料																													
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5mL 本色盖																													
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5mL 绿盖管																													
超纯水	210806	1 mL	1.5mL 蓝盖管																													
瓜类细菌性果斑病菌 qPCR 引物-探针混合液	yp15-1010	150 μL	0.5mL 棕色管																													
瓜类细菌性果斑病菌 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	Pc1010	50 μL	0.5mL 黄盖管																													
使用手册	15-1010sc	1 份	无																													
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、稀释标准曲线样品（以 10E1-10E6 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。

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 μL 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 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。

4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 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 的标准曲线样品。放冰上待用。

5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E4 拷贝/μL 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，最好设置 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 10μL 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（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（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最后加）：

成分	样品管	PCR 阴性	标准曲线样品管
----	-----	--------	---------

	N+2 个	对照	(1-6 管)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
瓜类细菌性果斑病菌 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加
超纯水	不加	7 μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7μL (2 号样 到 2 号管, 3 号 样到 3 号管…)

11. 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℃	2 min
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec
	58℃	30 sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 设置 BHQ-1 为淬灭基团)

五、数据处理

12. 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。

13. 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。

关联产品

瓜类细菌性果斑病菌荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒