

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:15-3080

低温运输, -20℃保存

**BINGENE**

## 玉米细菌性枯萎病菌 qPCR 试剂盒

*Pantoea stewartii subsp. Stewartii* Probe PCR 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: 400-6605850; 电邮: [order@bingene.com](mailto:order@bingene.com)

产品及特点	<p>玉米细菌性枯萎病菌 (<i>Pantoea stewartii subsp. stewartii</i>) 是一种黄色的、不运动、无内生孢子、革兰氏染色阴性、兼性厌氧杆菌，玉米的各个生长阶段都能够受到玉米细菌性枯萎病菌的侵染，典型的症状是矮缩和枯萎。病株在苗期可导致枯萎死亡，如果在植株生长后期被感染，植株可以长到正常大小。玉米细菌性枯萎病是一种维管束病害，导管里充满黄亮色细菌粘液，病株的横切面上可以看到渗出的粘液。因此快速灵敏诊断玉米细菌性枯萎病菌具有重要意义。本产品就是以探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测玉米细菌性枯萎病菌的试剂盒，它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板。</li><li>2. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/μL。</li><li>3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。</li><li>4. 特异性高，引物是根据玉米细菌性枯萎病菌 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。</li><li>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。</li><li>6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。</li><li>7. 本产品只能用于科研。</li></ol>		
规格及成分	成分	编号	五孔盒包装
	2×Probe qPCR MagicMix	190303	500μL (本色盖)
	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1mL (绿盖)
	超纯水	210806	1mL (亮黄盖)
	玉米细菌性枯萎病菌 qPCR 引物-探针混合液	yp15-3080	150μL (棕色管)
	玉米细菌性枯萎病菌 qPCR 阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	pd3080	50μL (黄盖)
	使用手册	15-3080sc	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、稀释标准曲线样品**（以  $10E1$ - $10E6$  拷贝/ $\mu$ L 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 $\mu$ 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 $\mu$ L  $1\times 10E7$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得  $1\times 10E6$  拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 $\mu$ L  $1\times 10E6$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1\times 10E5$  拷贝/ $\mu$ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 $\mu$ L  $1\times 10E5$  拷贝/ $\mu$ L 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得  $1\times 10E4$  拷贝/ $\mu$ L 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 10 $\mu$ L 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，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（20 $\mu$ L 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）：

	<b>成分</b>	<b>样品管 N+2 个</b>	<b>PCR 阴性 对照</b>	<b>标准曲线样品管 (1-6 管)</b>										
	2×Probe qPCR MagicMix	各 10μL	10μL	各 10μL										
	玉米细菌性枯萎病菌 qPCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL										
	N+2 个待测 DNA 样本	各 7μL	不加	不加										
	超纯水	不加	7μL	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 (1 号样 到 1 号管, 2 号 样到 2 号管…)										
	11. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 PCR:													
<table><tr><td><b>过程</b></td><td><b>温度</b></td><td><b>时间</b></td></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>5 min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>95℃</td><td>15 sec</td></tr><tr><td>60℃</td><td>60s (采集 FAM 通道的荧光信号)</td></tr></table>				<b>过程</b>	<b>温度</b>	<b>时间</b>	预变性	95℃	5 min	PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec	60℃	60s (采集 FAM 通道的荧光信号)
<b>过程</b>	<b>温度</b>	<b>时间</b>												
预变性	95℃	5 min												
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec												
	60℃	60s (采集 FAM 通道的荧光信号)												
<b>五、数据处理</b>														
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 Ct 必须等于或者大于 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。对待测样品, 如果其 Ct 小于 40 则为阳性。如果在大于或等于 40 则为阴性。														
<b>关联产品</b>	玉米细菌性枯萎病菌探针法 qPCR 检测试剂盒													