

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)

<b>产品及特点</b>	<p>玉米细菌性枯萎病菌 (<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>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 / <math>\mu\text{L}</math>。</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 20<math>\mu\text{L}</math> 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>																					
<b>规格及成分</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th><th>编号</th><th>五孔盒包装</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2 × Probe qPCR MagicMix</td><td>190303</td><td>500<math>\mu\text{L}</math> (本色盖)</td></tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td><td>180701</td><td>1mL (绿盖)</td></tr> <tr> <td>超纯水</td><td>210806</td><td>1mL (亮黄盖)</td></tr> <tr> <td>玉米细菌性枯萎病菌 qPCR 引物-探针混合液</td><td>yp15-3080</td><td>150<math>\mu\text{L}</math> (棕色管)</td></tr> <tr> <td>玉米细菌性枯萎病菌 qPCR 阳性对照(1 × 10E7 拷贝 / <math>\mu\text{L}</math>)</td><td>pd3080</td><td>50<math>\mu\text{L}</math> (黄盖)</td></tr> <tr> <td>使用手册</td><td>15-3080sc</td><td>1 份</td></tr> </tbody> </table>	成分	编号	五孔盒包装	2 × Probe qPCR MagicMix	190303	500 $\mu\text{L}$ (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	150 $\mu\text{L}$ (棕色管)	玉米细菌性枯萎病菌 qPCR 阳性对照(1 × 10E7 拷贝 / $\mu\text{L}$ )	pd3080	50 $\mu\text{L}$ (黄盖)	使用手册	15-3080sc	1 份
成分	编号	五孔盒包装																				
2 × Probe qPCR MagicMix	190303	500 $\mu\text{L}$ (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	150 $\mu\text{L}$ (棕色管)																				
玉米细菌性枯萎病菌 qPCR 阳性对照(1 × 10E7 拷贝 / $\mu\text{L}$ )	pd3080	50 $\mu\text{L}$ (黄盖)																				
使用手册	15-3080sc	1 份																				
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20°C 保存，保存期限为 12 个月。																					
<b>自备试剂</b>	样品 DNA。																					

## 使用方法

### 一、稀释标准曲线样品（以 10E1-10E6 拷贝/ $\mu\text{L}$ 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 $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$  1×10E7 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 $\mu\text{L}$  1×10E6 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 $\mu\text{L}$  1×10E5 拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E4 拷贝/ $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$ 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	标准曲线样品管 (1-6 管)
	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:

过程	温度	时间
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)

### 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 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。

关联产品	玉米细菌性枯萎病菌探针法 qPCR 检测试剂盒
------	-------------------------