

玉米细菌性枯萎病菌探针法 qPCR 试剂盒

Pantoea stewartii ssp. *Stewartii* Probe PCR Kit

CAT#:BN64075

低温运输, -20℃保存

产品及特点

玉米细菌性枯萎病菌 (*Pantoea stewartii* ssp. *Stewartii*) 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。该病菌是玉米生产的重大威胁, 因此对其进行快速灵敏诊断具有重要意义。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:

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, 分析灵敏度高, 可以达到 100 拷贝/反应。
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。
5. 既用于定性检测, 又用于定量检测。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 20 μ L 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

成分	编号	规格
2 $\times$ Probe qPCR MasterMix	60001	0.5 mL
荧光 PCR 模板专用稀释液	60002	1 mL
超纯水	60003	1 mL
玉米细菌性枯萎病菌 qPCR 引物-探针干粉	64075-4	50 次
玉米细菌性枯萎病菌 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/ μ L)	64075-5	50 μ L

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

	使用手册 1 份
	注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165 μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要 -20°C 保存。
运输及保存	低温运输，-20°C 保存，保存期限为 12 个月。
自备试剂	样品 DNA，超纯水，核酸纯化试剂盒。
使用方法	一、稀释标准曲线样品（以 $1\text{E}1$-$1\text{E}6$ 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 $1\text{E}7$ 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 $1\text{E}6$ 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 $1\text{E}6$ 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1\text{E}5$ 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 $1\text{E}5$ 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 $1\text{E}4$ 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 10 μL 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 μL 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):

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 MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
玉米细菌性枯萎病菌 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 7 μL (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℃	5 min
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15 sec
	60℃	60 sec (采集 FAM 通道的荧光 信号,淬灭基团是 BHQ)

注:部分 (如:伯乐 CFX96) 机型如果两步法效果不理想可采用三步法:95℃ 5 分钟,(95℃ 15 秒、55℃ 15 秒、72℃ 30 秒) 循环 40 次,每个循环第三步采集荧光信号。

四、数据处理

12. 如果样本制备阳性对照或 PCR 阳性对照(包括标曲样本)结果为阴性,则整个实验无效,不需要分析数据,需要重新样本制备,重新进行 PCR 扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或 PCR 阴性对照结果为阳性,说明环境污染,则整个实验无效,不需要分析数据,需要跟厂家联系。

13. 如果阴性对照和阳性对照均正常，则实验有效，可以进入后续分析。
14. 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。
15. 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。