



马铃薯环腐病菌探针法 qPCR 试剂盒

Clavibacter michiganensis ssp. *sepedonicus* Probe qPCR Kit

货号: JLC_Y7812

使

用

说

明

书

产品及特点	马铃薯环腐病菌 (<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>)，也叫密执安棒形杆菌环腐亚种，是一种杆状，无鞭毛的革兰氏阳性菌，菌体大小为 0.4~0.6 μm×0.8~1.2 μm。马铃薯环腐病菌会在马铃薯生长季节后期和结薯期侵染其叶片，从而导致马铃薯环腐病。该病是一种维管束病害，主要分布我国在华北地区。其特有的症状是通过挤压横切的病薯，维管束环外围的组织很容易和内部的分开，同时流出乳白色至奶酪状无气味的菌脓，内部的离析组织一起被排出。但约有 60% 感染了马铃薯环腐病的块茎，不显症状或症状轻微，通过种薯切刀后肉眼观察很难发现。另外，若该病发生在马铃薯植株生长期，其症状会与马铃薯青枯病相似，不易区分。伴随着我国各地种薯调运，该病的感染已遍及全国各马铃薯产区，导致发病率高的地块大幅度减产。在种薯贮藏期间，该病也会持续产生危害，严重时导致马铃薯块茎腐烂，大幅降低其经济价值。因此对马铃薯环腐病菌进行快速、准确检测具有重要的意义。本产品就是以探针法 qPCR 技术为基础开发的专门检测马铃薯环腐病菌的试剂盒，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/反应。 3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。 4. 特异性高，引物是根据马铃薯环腐病菌 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	成分	规格	包装
	2×Probe qPCR MasterMix	0.5mL	0.5mL 本色管
	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
	超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管
	马铃薯环腐病菌 qPCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 棕色管
	马铃薯环腐病菌阳性对照(1×10E7 拷贝/μL)	50μL	0.5mL 黄盖管
	使用手册	1 份	无
	本产品采用五孔盒包装		
	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 165μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。		
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，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，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 10μL	10μL	各 10μL
马铃薯环腐病菌 qPCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL
N+2 个待测 RNA 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

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℃	2min
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15sec

		58℃	30sec (采集 FAM 通道的荧光信号, 设置 BHQ-1 为淬灭基团)
	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。 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。 15. 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。		
自备试剂	样品 DNA。		
运输及保存	低温运输, -20℃保存, 有效期 1 年。		

生产企业: 上海机纯实业有限公司

公司地址: 上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603

公司电话: 021-54720761

技术支持: 13166274223