天净沙系列

CAT#:14-5229

低温运输，-20℃保存

天净沙

葡萄白粉病菌染料法 PCR 试剂盒

Erysiphe necator SYBR PCR Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

葡萄白粉病菌（*Erysiphe necator*）是一种属于子囊菌亚门的真菌，该病菌的菌丝透明，有隔膜，并能形成球状吸器以吸收养分。其分生孢子呈念珠状串生，闭囊壳成熟后呈黑褐色，含有多个子囊。它是葡萄白粉病的病原体，主要通过风传播，孢子落到寄主表面后萌芽侵入，主要侵染葡萄的叶片、新梢和果实。被该病菌感染后，病叶生长缓慢，叶片卷缩，表面覆盖灰白色粉状霉层，严重时，叶片枯萎脱落，叶脉变黑；新梢上出现星状病斑，表面有白粉覆盖，木质化后病斑变为褐色或黑色；花序梗受害后先变黄，随后变脆易折断，穗轴、果梗和枝条表面出现白色粉末，后期形成黑褐色斑；果实表面产生灰白色粉状霉层，糖分积累受阻，味酸，容易开裂，小幼果受害后生长受限，易枯萎脱落，大幼果则可能变硬、畸形，并出现纵向裂口。葡萄白粉病菌不仅影响葡萄的生长，还会降低果实品质和产量，对葡萄种植产业有较大危害，因此快速检测葡萄白粉病菌具有重要的意义。本产品是以染料法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测葡萄白粉病菌的试剂盒，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. 引物经过优化，灵敏度高，分析灵敏度可以达到 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于制备标准曲线和排除无效实验结果。
4. 特异性高，引物是根据葡萄白粉病菌 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的染料法荧光定量 PCR 反应。
6. 既可用于定性，也可用于定量。用于定量时线性范围至少 5 个数量级。
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	包装
2×SYBR qPCR MasterMix	990408	0.5 mL	0.5 mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
葡萄白粉病菌 染料法 qPCR 引物干粉	yw15-5229	50 次	0.5 mL 白盖管
葡萄白粉病菌 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	pc5229	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	14-5229sc	1 份	无

注意：引物干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 110 μL 的超纯水充分混匀后得到引物探针混合液再使用，未用完的需要-20℃保存。

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 1E1-1E6 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 1E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 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 1E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E5 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 1E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E4 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 第 6 步所得的第 4 号稀释液（1E4 拷贝/μL）再加上一定量的水使总体积跟核酸纯化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，也可使用本公司的免提取核酸释放剂。 **三、染料法 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（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 阴性对照管	标准曲线 样品管（1-6 管）

2×SYBR qPCR MasterMix	10 μL	10 μL	各 10 μL
葡萄白粉病菌染料法 qPCR 引物混合液	2 μL	2 μL	各 2 μL
N+2 个待测 DNA 模板	8 μL	不加	不加
超纯水	不加	8 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 8 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℃	10 min
PCR 反应（35 个循环）	95℃	15 sec
	X℃	15 sec
	72℃	30 sec（采集 SYBR 通道的荧光信号）
溶解曲线分析		按 qPCR 仪器手册执行

四、数据处理

12. 通过溶解曲线分析排除无效数据。有 Ct 值，但 Tm 值跟阳性对照 Tm 不一样的结果，归为假阳性，此样本 Ct 数据无效，不予以分析。Tm 跟阳性对照 Tm 一致的，为有效 Ct。
13. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 PCR 阴性对照）的溶解曲线所得 Tm 值跟阳性对照的 Tm 值一样，说明环境或试剂可能有过去的 PCR 扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。如果两种阳性对照（样品制备阴性对照和 PCR 阴性对照）无 Ct 值则无效。
14. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 PCR 阴性对照）是假阳性，有 Ct 但 Tm 与阳性样本不同，实验有效可以继续分析其它样品有效数据。
15. 对定量检测，以阳性对照样品的浓度的 log 值为横轴，以有效 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再换算出待测样品的 DNA 浓度。
16. 对定性检测，则有有效 Ct 值的为阳性，无有效 Ct 值的为阴性。

关联产品	葡萄白粉病菌可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒