天净沙系列

CAT#:15-34750

低温运输，-20℃保存

天净沙

尖孢镰刀菌探针法 qPCR 试剂盒（不含内参）

Fusarium oxysporum Probe qPCR Kit

使用手册 V1.0

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

尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum*）属半知菌类、从梗孢目、瘤座孢科、镰刀菌属，是一种最重要的土传病原菌，被评为世界第五大病原真菌，易导致植株枯萎病，根腐病等。尖孢镰刀菌的分生孢子是许多植物致病真菌引起感染和疾病传播的重要载体，因此尖孢镰刀菌的快速检测具有重要意义。为此本公司以探针法 qPCR 技术为基础开发了尖孢镰刀菌的检测试剂盒，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，灵敏度高，最低检测限可达 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，引物是根据尖孢镰刀菌基因组 DNA 高度保守区设计，不会跟其它生物的 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 5 个数量级。
6. 本产品足够 50 次 20 μL 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

本产品使用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	981201	500 μL	0.5 mL 本色盖
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	1.5mL 蓝盖管
尖孢镰刀菌 qPCR 引物-探针干粉	yp15-34750pv	50 次	0.5 mL 棕色管
尖孢镰刀菌阳性对照 (1E7 拷贝/μL)	pc34750-OR838857	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	sc15-34750	1 份	1 份

注意：引物-探针干粉在使用前需要离心，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℃保存。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备物品

超纯水，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。本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供 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)，充分震荡混匀 1 分钟，得到 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)，充分震荡混匀 1 分钟，得到 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(上步所得)，充分震荡混匀 1 分钟，得到 1E4 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 依次重复上面的操作得到 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、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+3 个	PCR 阴性 对照管	标曲样品管 (1-6)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
尖孢镰刀菌 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
待测样本 DNA 模板	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（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	94℃	2 min
PCR 反应（40 个循环）	94℃	30 sec
	60℃	48 sec（采集 FAM 通道，淬灭基团为 TAMRA）

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℃ 10 分钟，（94℃ 15 秒、52℃ 15 秒、72℃ 30 秒）循环 35-45 次，每个循环第三步采集荧光信号。

四、数据处理

12. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系，购买新的引物和探针。
13. 如果阴性对照和阳性对照正常，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。

关联产品	尖孢镰刀菌可视化-荧光染料 LAMP 试剂盒