天净沙系列

CAT#:14-75123

低温运输，-20℃保存

柑橘僵化螺原体染料法 qPCR 试剂盒

Spiroplasma citri SYBR 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

柑橘僵化螺原体是柑橘生产上一种严重的病害。在炎热的气候条件下，病害能大大降低果实的产量和质量。由于病害能通过昆虫介体传播，因此顽固病的防治很困难。其病原体 Spiroplasma Citri 通过苗木和接穗传播，田间由叶蝉传播。柠檬螺原体侵染寄主韧皮部的筛管组织。病原体持久侵染植株，直到植株衰退。实际上，它是一种专性寄生物，存活在柑橘及其他寄主的体内，而不腐生在植株表面。因此快速灵敏检测柑橘僵化螺原体具有重要意义。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柑橘僵化螺原体的试剂盒，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，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据柑橘僵化螺原体 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
柑橘僵化螺原体 qPCR 引物干粉	yw14-75123	50 次	0.5 mL 白盖管
柑橘僵化螺原体 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	pc75123-CP047426	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	14-75123sc	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 PCR 阳性对照（以 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例）

注意：由于阳性对照浓度非常高，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，只提供可以直接使用的 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 μL1E7 拷贝/μL 的阳性对照，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL1E6 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 的阳性对照。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL1E5 拷贝/μL 的阳性对照到 5 号管中，充分震荡 1 分钟，得 1E4 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上用。

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、设置 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	PCR 阳性 对照管（1-6 管）
2×SYBR qPCR MasterMix	10 μL	10 μL	各 10 μL
柑橘僵化螺原体 qPCR 引物混合液	2 μL	2 μL	各 2 μL

N+2 待测样品 DNA 模板	8 μL	不加	不加
自备超纯水	不加	8 μL	不加
第 6 步所得 PCR 阳性对照稀释液（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℃	3 min
PCR 反应 (35 个循环)	95℃	15 sec
	60℃	1 min（采集 SYBR 通道的荧光信号）
溶解曲线分析		

注意：循环次数不要超过 35 个循环。

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℃ 3 分钟，(95℃ 15 秒、55℃ 15 秒、72℃ 30 秒）循环 35 次，每个循环第三步采集荧光信号。

四、数据处理

12. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有 Ct 值，但 Tm 值跟阳性对照 Tm 不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，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。
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，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	柑橘僵化螺原体可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒