



## 柑橘黄龙病菌亚洲种染料法荧光定量 PCR 试剂盒

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

官方 Q Q： 2881498548

官方网址：[www.tw-reagent.com](http://www.tw-reagent.com)

监督电话：021-5484583

### 产品及特点：

柑橘黄龙病菌亚洲种(*Candidatus Liberobacter Asiaticus*)是一种类菌体，柑橘感染黄龙病后，全年均可发生，一般以夏梢和秋梢发病最多，其次是春梢。新梢的症状是叶片表现黄化和黄绿相间的斑驳。在叶片凋落后，枝梢上新长出的叶片表现缺素状的花叶。病梢变短、生势衰弱，病叶黄厚、变小，且易脱落，形成枯枝。开花不适时，花开的多、落得多。果小而畸形，或红鼻果。后期，根部往往表现为小根腐烂。此菌可以侵染芸香科柑橘属和金橘属植物，引发症状。通过菟丝子，此菌可以侵染长春花。在自然界，芸香科蚝壳刺属和木苹果属植物可能受此菌侵染，九里香属植物常见着生大量传播柑橘黄龙病的柑橘木虱，但其体内未见病原菌。本公司开发柑橘黄龙病菌染料法荧光定量 PCR 试剂盒。

- 1.即开即用，用户只需要提供病毒样品。
- 2.根据柑橘黄龙病菌亚洲种保守序列设计的专一性引物，与相关病毒无交叉反应。
- 3.灵敏度可以达到几百拷贝/反应。
- 4.一管式荧光定量 PCR 检测，避免后续污染。
- 5.本试剂盒足够 50 次 20 $\mu$ L 反应体系的荧光定量 PCR。

### 规格及成分：

编号	成分	规格
试剂一	2 $\times$ qPCRMagicMix	500 $\mu$ L(棕色管)
试剂二	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL(黄盖)
试剂三	柑橘黄龙病菌亚洲种染料法 PCR 引物混合液	100 $\mu$ L(白盖)
试剂四	柑橘黄龙病菌亚洲种染料法 PCR 阳性对照(1 $\times$ 10E8/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L(红盖)
试剂五	DNA 病毒裂解液(试用装)	15 次(9mL)
	使用手册	1 份

### 运输及保存：

低温运输、-20 $^{\circ}$ C 保存，有效期一年。



## 自备试剂：

DNA 模板、10×ROX(根据机型决定，具体见使用方法)。

## 使用方法：

### 一、稀释 PCR 阳性对照(以 10E2-10E7 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例)：

1.注意：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，只提供可以直接使用的 DNA 片段作为阳性对照。

2.标记 6 个离心管，分别为 7，6，5，4，3，2。

3.用带芯枪头分别加入 45μL 荧光 PCR 专用模板稀释液(最好用带芯枪头，下同)。

4.在 7 号管中加入 5μL1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照，充分震荡 1 分钟，得 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。

5.换枪头，在 6 号管中加入 5μL1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。

6.换枪头，在 5 号管中加入 5μL1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照到 5 号管中，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。

7.重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。

### 二、样品 DNA 的制备：

8. 如果有 N 个样品，必须设置 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 上步制备的 PCR 阳性对照的第 4 号(浓度为 1×10E4 拷贝/μL，10μL 相当于 1 万拷贝)或第 5 号(浓度为 1×10E5 拷贝/μL，10μL 相当于 10 万拷贝)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。如果每次制备需要 200μL 样品，则 PC 和 NC 的体积也必须是 200μL。

9. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的一管式病毒 DNAout 或其升级版柱式病毒 DNAout。本试剂盒免费赠送 15 次一管式病毒 DNAout。

### 三、设置 qPCR 反应(20μL 体系，在样品制备室进行)：

10. 如果只做 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，6 个用于 PCR 阳性对照。如果做 2-3 次重复，则反应设置数量相应增加 2 或 3 倍。

11. 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 (2-7 管)
2×qPCR MagicMix(棕色管)	10μL	10μL	各 10μL
柑橘黄龙病菌亚洲种 PCR 引物混合液(白盖)	2μL	2μL	各 2μL
自备 10×ROX(见注)	2μL	2μL	各 2μL
N+2 待测样品 DNA 模板	6μL	不加	不加
第 7 步所得 PCR 阳性对照稀释液(2-7 号)	不加	不加	各 6μL2 号样到 2 号管,3 号样到 3 号管



**注：**仅 ABI7500、7700 和 7900 仪器需要使用 ROX 作为对照,其他荧光 PCR 仪器(如 iCycler IQ、MJ Option、MJ Chromo4、MX3000、MX4000、RotorGene3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480)不需要使用 ROX, 则用水替代。

12. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 PCR(具体 PCR 参数可以根据仪器不同而自行优化)。

过程	温度	时间
预变性	92°C	5 分钟
PCR 反应 30 个循环	94°C	60 秒
	50°C	60 秒
	72°C	60 秒

13. 数据采集

具体操作按所用仪器推荐的流程进行。本产品中所含的荧光染料在不结合 DNA 时,最大吸收光谱在 471nm,结合 DNA 时的最大吸收光谱在 500nm, 最大发射光谱在 530nm。信号采集可以设置在复性或延伸步骤。

**四、数据处理：**

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 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长, 有典型扩增曲线, Ct 值应该小于或等于 30。对待测样品, 如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性, 如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间, 则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性, 如果小于 40, 则为阳性。

**五、特别提示：**

**本公司的所有产品, 仅可用于科研实验, 严禁用于临床医疗及其他非科研用途!**