

天
净
沙
系
列

CAT#:14-57100

低温运输, -20℃保存

TIANDZ

沃尔巴克氏菌染料法荧光定量 PCR 试剂盒

Wolbachia spp. SYBR qPCR Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>沃尔巴克氏菌(<i>Wolbachia spp.</i>)为革兰氏阴性菌, 又称为沃尔巴克氏体, 属于变形菌纲 Proteobacteria 的 α 亚门, 立克次氏体科乌巴克体族乌巴克体属中的一种, 1924 年由 Hertig 和 Wolbach 在尖音库蚊 <i>Culex pipiens</i> 的生殖组织里首次被发现。沃尔巴克氏菌是自然界分布最为广泛的一种共生菌, 在鞘翅目、双翅目、半翅目、同翅目、膜翅目、鳞翅目、直翅目和啮目等 10 多个目的 150 万—500 万种昆虫中都有共生。沃尔巴克氏菌感染昆虫和其它节肢动物后, 会导致昆虫和其他节肢动物无法产生雄性后代。21 世纪初, 对沃尔巴克氏菌的研究成为热点。科学家们在积极寻找控制沃尔巴克氏菌的新方法或开发消灭沃尔巴克氏菌的新药物, 原因在于一旦控制或消灭沃尔巴克氏菌则有可能消除或抑制病原性宿主对人类、禽畜和作物造成的伤害。因此快速检测沃尔巴克氏菌具有重要意义。荧光定量 PCR 是检测传染性疾病的主流技术, 本产品就是以染料法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测沃尔巴克氏菌的试剂盒, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即开即用, 用户只需要提供 DNA 模板。 2. 特异性高, 引物是根据人沃尔巴克氏菌高度保守区设计, 不会扩增其他细菌和微生物。 3. 引物和扩增体系经过优化, 灵敏性比常规 PCR 高 100 倍。 4. 提供无传染性的 PCR 阳性对照, 便于区分假阴性样品。 5. 一管式操作, 荧光 PCR 检测, 不容易产生环境污染。 6. 本产品只能用于科研, 本试剂盒足够 50 次 20μL 体系的 PCR。 																							
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2\timesqPCR MagicMix</td> <td>90408</td> <td>0.5 mL (棕色)</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>180701</td> <td>1 mL (黄盖)</td> </tr> <tr> <td>沃尔巴克氏菌 PCR 引物</td> <td>14-57100yw</td> <td>100 μL (白盖)</td> </tr> <tr> <td>沃尔巴克氏菌阳性对照 (1\times10E8 拷贝/μL)</td> <td>14-57100pc</td> <td>50 μL (红盖)</td> </tr> <tr> <td>天净沙 DNA 释放剂试用装</td> <td>130982</td> <td>50 次 (试用装)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>14-57100sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	十孔盒包装	2 \times qPCR MagicMix	90408	0.5 mL (棕色)	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (黄盖)	沃尔巴克氏菌 PCR 引物	14-57100yw	100 μ L (白盖)	沃尔巴克氏菌阳性对照 (1 \times 10E8 拷贝/ μ L)	14-57100pc	50 μ L (红盖)	天净沙 DNA 释放剂试用装	130982	50 次 (试用装)	使用手册	14-57100sc	1 份
成分	编号	十孔盒包装																						
2 \times qPCR MagicMix	90408	0.5 mL (棕色)																						
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL (黄盖)																						
沃尔巴克氏菌 PCR 引物	14-57100yw	100 μ L (白盖)																						
沃尔巴克氏菌阳性对照 (1 \times 10E8 拷贝/ μ L)	14-57100pc	50 μ L (红盖)																						
天净沙 DNA 释放剂试用装	130982	50 次 (试用装)																						
使用手册	14-57100sc	1 份																						
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输, -20$^{\circ}$C 保存, 保存期限为 12 个月。</p>																							
<p>自备试剂</p>	<p>样品 DNA。</p>																							

使用方法

一、稀释标准曲线样品 (以 $10E2$ - $10E7$ 拷贝/ μ L 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 7, 6, 5, 4, 3, 2。
2. 用带芯枪头分别加入 45 μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液, 最好用带芯枪头, 下同)。
3. 在 7 号管中加入 5 μ L $1 \times 10E8$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 $1 \times 10E7$ 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 6 号管中加入 5 μ L $1 \times 10E7$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 $1 \times 10E6$ 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 5 号管中加入 5 μ L $1 \times 10E6$ 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 $1 \times 10E5$ 拷贝/ μ L 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, 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 10 μ L 上步制备的标准曲线样品的第 4 号 (浓度为 $1 \times 10E4$ 拷贝/ μ L, 10 μ L 相当于 1 万拷贝) 或第 5 号 (浓度为 $1 \times 10E5$ 拷贝/ μ L, 10 μ L 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 200 μ L 样品, 则 PC 和 NC 的体积也必须是 200 μ L。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA, 本试剂盒跟市场上大多数细菌 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的细菌 DNAout 或柱式细菌 DNAout。本试剂盒免费赠送 50 次免 DNA 提取的天净沙 DNA 释放剂, 其使用手册可从本公司网站 www.tiandz.com 通过搜索产品名称天净沙 DNA 释放剂或产品编号 130982 下载。

三、设置 qPCR 反应 (20 μ L 体系, 在样品制备室进行)

9. 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 个用于标准曲线样品。如果做 2-3 次重复, 则反应设置数量相应增加 2 或 3 倍。
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 (2-7 管)
2×qPCR MagicMix (棕色管)	10 μL	10 μL	各 10 μL
沃尔巴克氏菌 PCR 引 物混合液 (白盖)	2 μL	2 μL	各 2 μL
自备 10×ROX (见注)	2 μL	2 μL	各 2 μL
待测样品 DNA 模板	6 μL	不加	不加
第 7 步所得标准曲线样 品稀释液 (2-7 号)	不加	不加	各 6μL (2 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、RotorGene 3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480)不需要使用 ROX,则用水替代。

11. 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)。

四、荧光定量 PCR 反应参数

过程	温度	时间
预变性	94℃	5 min
PCR 反应 (35 个循环)	94℃	0.5 min
	50℃	0.5 min (采集 SYBR 通道的 荧光信号)
	72℃	0.5 min
最后延伸	72℃	10 min

五、数据处理

12. 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。

五、电泳检测

13. 如果有必要电泳确认,可取 10-20 uL PCR 产物直接在琼脂糖凝胶上电泳产物的大小为 400 bp。

关联产品

沃尔巴克氏菌 可视化 LAMP 检测试剂盒