



狄斯瓦螨探针法荧光定量 PCR 试剂盒

产品及特点:

狄斯瓦螨(*Varroa destructor*)是对世界养蜂业威胁最大的蜜蜂病虫害。200 年重新命名之前, 它一直被称为雅氏瓦螨(*Varroa jacobsoni* Oudemans1904)。2000 年初, 澳大利亚安德森(Denis L.Anderson)对采集自亚洲各地东方蜜蜂(蜂螨原始寄主)和世界各地西方蜜蜂的大量蜂螨样本进行线粒体 DNA 测序的综合研究, 结果表明:原被归入雅氏瓦螨的东方蜜蜂寄生螨, 应划分为 2 个种, 一个是新界定的雅氏瓦螨, 主要分布在印尼和马来西亚, 已发现 9 个基因型; 另一个是新定名的狄斯瓦螨, 分布于亚洲大陆的东方蜜蜂和世界各地的西方蜜蜂, 已发现 11 个基因型。本产品以染料法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测狄斯瓦螨的试剂盒。

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, 灵敏性高。
3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。
4. 特异性高, 引物是根据狄斯瓦螨高度保守区设计, 不会跟其他病毒 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分:

编号	成分	规格
试剂一	2 $\times$ Probe qPCR MagicMix	500 μ L(本色盖)
试剂三	荧光 PCR 专用模板稀释液	1 mL(黄盖)
试剂二	狄斯瓦螨 qPCR 引物混合液	100 μ L(白盖)
试剂四	狄斯瓦螨 qPCR 探针	50 μ L(棕色管)
试剂五	狄斯瓦螨探针法 qPCR 阳性对照(1 $\times$ 10E8/ μ L)	50 μ L(红盖)
	使用手册	1 份



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 $10E2$ - $10E7$ 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。
6. 放冰上待用。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 μ L 阳性对照的 10000 倍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 DNA 提取试剂盒兼容。

三、Probe qPCR 反应 (20 μ L 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 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）：

成份	N+2 个样品管	PCR 阴性对照管	标准曲线样品管(2-7 管)
2 $\times$ ProbeqPCRMagicMix	10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
狄斯瓦螨 qPCR 探针	1 μ L	1 μ L	各 1 μ L
狄斯瓦螨探针法 qPCR 引物混合液	2 μ L	2 μ L	各 2 μ L
N+2 个待测 DNA 模板	7 μ L	--	--
超纯水	--	7 μ L	--
第 7 步所得标准曲线样品稀释液(2-7 号)	--	--	各 7 μ L(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 $^{\circ}$ C	3min
PCR 反应 40 个循环	95 $^{\circ}$ C	15sec
	60 $^{\circ}$ C	1min(采集 FAM 通道的荧光信号)

四、数据处理:

12. 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 RNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。



13. 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。若重复结果 Ct 值小于 40，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

上海纪宁实业有限公司(www.shjning.com)所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。