天净沙系列

CAT#:15-3640v2

低温运输，-20℃保存

天净沙

马铃薯纺锤块茎类病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒 V2.0

Potato Spindle Tuber Viroid Probe qRT-PCR Kit V2.0

使用手册 V1.11

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

本产品就是在马铃薯纺锤块茎类病毒（Potato Spindle Tuber Viroid，PSTVd）探针法 RT-PCR 产品基础上升级的试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品 RNA 模板。
2. 干粉型，可常温运输低温保存，而且最高样本加入量达到 15 μL，降低了漏检率。
3. 引物和探针经过优化升级，分析灵敏度高，可以达到 100 拷贝/反应。
4. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
5. 特异性高，引物是根据 PSTVd RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。
7. 本产品足够 48 次 20 μL 体系的探针法 qRT-PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用带 logo 热封袋包装

成分	编号	规格	包装
RT-PCR MasterMix 冻干微球	250805	8 次×6	密封八联排管
荧光 PCR 模板专用稀释干粉	180701	48 T	1.5 mL 绿盖管
PSTVd qRT-PCR 引物-探针干粉	yp15-3640ql3-v2.1	48 T	0.5 mL 棕色管
PSTVd qRT-PCR 阳性对照干粉	pc3640-AF483471-ql	48 T	0.5 mL 黄盖管
使用手册	15-3640v2sc	1 份	1 份

注意：引物-探针干粉在首次使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165 μL 的超纯水充分混匀后得到引物-探针混合液；荧光 PCR 模板专用稀释干粉在首次使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 1 mL 的超纯水充分混匀后得到荧光 PCR 模板专用稀释液，放冰上待用；马铃薯纺锤块茎类病毒 qRT-PCR 阳性对照干粉在首次使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 50 μL 的荧光 PCR 模板专用稀释液充分混匀后得到 1E7 拷贝/μL 的马铃薯纺锤块茎类病毒 qRT-PCR 阳性对照，以上溶液均放冰上待用，上述溶液实验未用完时需放-20℃保存。。

运输及保存

常温运输，低温保存，保存期限为 12 个月。

自备试剂

样品 RNA。

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。

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（使用前配制所得），充分震荡 1 分钟，得 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 1 分钟，得 1E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 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 RNA 的制备

6. 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核酸制备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。
7. 用自选方法纯化样品的 RNA，本试剂盒跟市场上大多数样品 RNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的免提核酸释放剂。

三、Probe qRT-PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

8. 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 个用于扩增阴性对照，6 个用于标准曲线样品。
9. 将装有 RT-PCR MasterMix 冻干微球的八连排管标注出 N+2 个作为样本管，标注 1 个于作为扩增阴性对照管，标注 6 个作为标曲样本管（如果只做定性检测，则此处改成 1 个扩增阳性对照管）：

成分	样品管 (N+2 个)	扩增阴性 对照管	标曲样品管 (1-6 管)
PSTVd qRT-PCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测样品	15 μL	不加	不加
第 5 所得标准曲线 样品稀释液（1-6 号）	不加	不加	各 15 μL(2 号样到 2 号管， 3 号样到 3 号管…)

注：如果减少样本的用量，必须加入等量的超纯水使加入成份的总体积为 18 μL，在最后计算浓度时稀释度要相应改变。

10. 加入后轻柔吹打数次混匀，短暂离心 10 秒，盖上盖子后上机，按下面参数进行 RT-PCR：

过程	温度	时间
逆转录	50℃	10 min
预变性	95℃	3 min
PCR 反应	95℃	15 sec

（45 个循环）	60℃	30 sec
	72℃	30 sec（采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 MGB）

注：由于不同 PCR 仪机型之间存在差异，所以参数需要进行微调。

四、数据处理

11. 本试剂盒阴性阳性判断 Ct 阈值为 37。如果一个反应无 Ct 或 Ct 大于或等于阈值，则判为阴性。如果一个反应 Ct 小于阈值，并且有标准的倒 S 型扩增曲线，则判为阳性。如果一个反应 Ct 小于阈值，但没有标准的倒 S 型扩增曲线，则此反应需要重复检测，一次做三个重复。按简单多数判断。如果还是一个反应 Ct 小于阈值，但没有标准的倒 S 型扩增曲线，则判断为阴性。三个反应中有两个或两个以上为阳性则判为阳性，有两个或两个以上为阴性则判断为阴性。
12. 如果样本制备阳性对照或扩增阳性对照结果为阴性（对定性实验，1E4 拷贝/μL 的样本为阳性对照。对定量实验，浓度从 E2 到 E6 拷贝/μL 的 5 个标曲样本可以当作阳性对照样本，其中任何一个为阴性都算扩增阳性对照为阴性），则整个实验无效，不需要分析数据，需要重新样本制备，重新进行 RT-PCR 扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或扩增阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系。
13. 如果阴性对照和阳性对照均正常，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 6 个标曲样本浓度的 log 值为横轴，以各自的 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，再从 log 值推算出其在反应管中的浓度（拷贝/反应），再根据此浓度推算加入反应管前纯化后的 RNA 溶液浓度（拷贝/μL），再结合核酸纯化时起始材料用量和最后得到的RNA体积计算出纯化前的样本的起始浓度(对实体组织单位为拷贝/mg，对液体材料单位是拷贝/mL）。
15. 如果把本试剂盒用于定性检测，则核酸纯化阴性对照和扩增阴性对照都必须阳性。同时，核酸纯化阳性对照和扩增阳性对照也必须是阴性，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，判断标准见第 12 步。

关联产品	马铃薯纺锤块茎类病毒可视化染料-荧光染料 RT-LAMP 试剂盒