天净沙系列

CAT#:15-3700-6

低温运输，-20℃保存

天净沙

马铃薯病毒 PVX、PVY、PLRV、PVS、PVM、PVA 六重探针法 RT-PCR 试剂盒

Potato Viruses PVX、PVY、PLRV、PVS、PVM、PVA Hexaplex Probe RT-PCR Kit

使用手册 V0.5

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

本产品是针对马铃薯六大病毒 PVX、PVY、PLRV、PVS、PVM、PVA，以探针法 RT-PCR 技术为基础开发的分型试剂盒，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. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，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，引物根据 SA 的 RNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。
5. 可以用于分型，两管式扩增，一次能区分 6 种马铃薯病毒。
6. 本产品主要用于定性检测和分型，不建议用于定量。分型后可以再另购定量试剂盒。
7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 RT-PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用十一孔盒包装

成分	编号	规格	包装
探针法 RT-PCR 缓冲液	990504a	500 μL	0.5 mL 蓝盖管
探针法 RT-PCR 酶混合液 v2	990504bv2	100 μL	0.5 mL 红盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 绿盖管
PVX、PVY、PLRV 探针法 RT-PCR 引物-探针混合液干粉	yp15-3700-6pt1	50 次	0.5 mL 棕色盖
PVS、PVM、PVA 探针法 RT-PCR 引物-探针混合液干粉	yp15-3700-6pt2	50 次	0.5 mL 棕色盖
PVX 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc3700	50 μL	0.5 mL 黄色盖
PVY 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc3710	50 μL	0.5 mL 黄色盖
PLRV 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	Pc3620	50 μL	0.5 mL 黄色盖
PVS 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	Pc3680	50 μL	0.5 mL 黄色盖
PVM 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	Pc3670	50 μL	0.5 mL 黄色盖
PVA 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	Pc3660	50 μL	0.5 mL 黄色盖
使用手册	15-3700-6sc	1 份	无

注意：在使用前需要短暂离心引物-探针干粉管，然后分别在两只引物-探针混合液干粉离心管中各加入 275 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 RNA。

使用方法

一、样品 RNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，最好设置 N+7 个提取，多出的六个是已知为 PVX、PVY、PLRV、PVS、

PVM、PVA 阳性的 PPC（样品制备阳性对照），一个是 PNC（样品制备阴性对照），可以用自备的、确定是阴性的样本作为 PNC，也可以用水替代。

2. 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核酸纯化试剂盒。

二、设置 PVX、PVY、PLRV 三重 Probe RT-PCR 反应（20 μL 体系）

3. 如果每个样本只做 1 次重复，则需要标记（N+3）+ 4 个 RT-PCR 管，多出的四个中三个用于 PVX、PVY、PLRV 的 APC（RT-PCR 扩增阳性对照），一个用于 ANC（RT-PCR 扩增阴性对照）。分别在各管加入：

成分	样品管 N+3 个	ANC	PVX APC	PVY APC	PLRV APC
探针法 RT-PCR 缓冲液	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
探针法 RT-PCR 酶混合液 v2	各 2 μL	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
PVX、PVY、PLRV 探针法 RT-PCR 引物-探针混合液干粉	各 4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
N+3 个待测 RNA 样本	各 4 μL	不加	不加	不加	不加
超纯水	不加	4 μL	不加	不加	不加
PVX 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	4 μL	不加	不加
PVY 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	4 μL	不加
PLRV 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	不加	4 μL

三、设置 PVS、PVM、PVA 三重 Probe RT-PCR 反应（20 μL 体系）

4. 如果每个样本只做 1 次重复，则需要标记（N+3）+ 4 个 RT-PCR 管，多出的四个中三个用于 PVS、PVM、PVA 的 APC（RT-PCR 扩增阳性对照），一个用于 ANC（RT-PCR 扩增阴性对照）。分别在各管加入：

成分	样品管 N+3 个	ANC	PVS APC	PVM APC	PVA APC
探针法 RT-PCR 缓冲液	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
探针法 RT-PCR 酶混合液 v2	各 2 μL	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
PVS、PVM、PVA 探针法 RT-PCR 引物-探针混合液干粉	各 4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
N+3 个待测 RNA 样本	各 4 μL	不加	不加	不加	不加
超纯水	不加	4 μL	不加	不加	不加
PVS 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	4 μL	不加	不加
PVM 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	4 μL	不加
PVA 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	不加	4 μL

四、Probe RT-PCR 反应（20 μL 体系）

5. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 RT-PCR：

过程	温度	时间
预变性	95℃	10 min
RT-PCR 反应 （45 个循环）	95℃	15 sec
	60℃	对 PVX、PVY、PLRV 三重 RT-PCR，设置 60 sec（采集 FAM、VIC、ROX 三个通道的荧光信号，淬灭基团分别为 MGB） 对 PVS、PVM、PVA 三重 RT-PCR，设置 60 sec（采集 FAM、VIC、ROX 三个通道的荧光信号，淬灭基团分别为 MGB）

五、数据处理

6. 如果 PPC 和 APC 结果均为阴性，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果 PNC 或 ANC 结果为阳性，说明环境污染，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系，购买新的引物和探针。

7. 如果阴性对照和阳性对照正常，则实验有效，可以进入后续分析。

8. 对定性检测，只判断阳性或阴性。

PVX、PVY、PLRV 结果判定		
FAM	Ct 值小于或等于 44	PVX 阳性
	Ct 值大于 44	PVX 阴性
VIC	Ct 值小于或等于 35	PVY 阳性
	Ct 值大于 35	PVY 阴性
ROX	Ct 值小于或等于 45	PLRV 阳性
	Ct 值大于 45	PLRV 阴性

PVS、PVM、PVA 结果判定		
FAM	Ct 值小于或等于 44	PVS 阳性
	Ct 值大于 44	PVS 阴性
VIC	Ct 值小于或等于 35	PVM 阳性
	Ct 值大于 35	PVM 阴性
ROX	Ct 值小于或等于 45	PVA 阳性
	Ct 值大于 45	PVA 阴性

关联产品 马铃薯卷叶病毒探针法 qRT-PCR 试剂盒（不含内参）