



Taq[®]新德里番茄曲叶病毒 (ToLCNDV) RAA-LFS核酸检测试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

货号: LFS0611

储存条件:

Buffer、对照需于 4 °C 以下避光保存, 避免重压和反复冻融, 有效期为 6 个月。

冻干球试剂、裂解液和研磨袋于常温、防潮储存, 有效期为 12 个月。

LFS 检测试纸条开封后, 筒盖需以封口膜或保鲜膜密封, 并于 4 ~30 °C 干燥处避光保存, 有效期为 12 个月。

包装规格: 48T

试剂盒组成:

用途	名称	次数	数量	保存条件
样品的研磨与裂解	研磨袋	48 次	48 袋	常温
样品核酸裂解	裂解液	50 毫升	1 瓶	常温
核酸扩增	冻干球试剂	48 份	3 包×2 支	常温干燥
	ToBRFV Buffer	350 微升	3 管	4 °C
对照	ToBRFV 阳性对照	40 微升	1 管	4 °C
	ToBRFV 阴性对照	40 微升	1 管	4 °C
单靶标核酸扩增产物检测	LFS 检测试纸条	48 条	1 筒	常温
说明书	说明书	1 份	1 份	常温

实验条件配置:

非污染区: 涉及试剂盒的储存, 反应体系的配置, 阴性对照的添加。要求空间独立, 移液枪专用。

污染区: 涉及检测样品的裂解, 检测模板的添加, 阳性对照的添加, 试纸条显色。要求空间独立, 移液枪专用。

污染区与非污染区必须独立, 移液枪、移液枪头不能交叉使用。试剂盒各组分 (除阳性对照) 不能出现在污染区中。

所有离心振荡混匀必须彻底混匀, 确保体系各组分充分混匀。

操作步骤:

1. 反应体系配置, 非污染区完成

设所需扩增管数为 n ($n = \text{样本数} + 1 \text{ 管阴性对照} + 1 \text{ 管阳性对照}$)。从扩增试剂盒中取出 Buffer, 室温融化后, 瞬时离心。将 20 微升 Buffer 分别加入 n 个含有冻干球的扩增反应管; 先添加 5 微升阴性对照后, 盖好阴性对照管盖, 用剪刀单独将阴性管盖剪开, 反应完成前不再打开。

2. 样本采集, 污染区完成

叶片: 采集具有花叶、变色、皱缩、矮化和坏死等植物病毒病害典型症状植株顶部的新叶。取样时, 戴好乳胶手套和 PE 手套, 使用打孔器 (BFT-SP-001) 对疑似病毒感染的顶端新叶打孔取样。可在新叶上采集 3~6 个不同位置取样 (约 30~60 毫克叶片组织), 并将采集的样品放入研磨袋内 (图 1)。如无打孔器, 也可佩戴 PE 手套后撕取约 1 厘米见方的叶片样本, 放入研磨袋内。

种子: 按 0.5 克种子为一组取样。种子带毒量较低时, 直接检测易发生漏检。如想获得最佳的检测效果, 建议将 0.5 克种子萌发 (番茄或辣椒种子看到子叶萌出) 后, 将萌发后的种子倒入研磨袋内研磨检测。



图1 样品的采集与研磨

3. 样品裂解，污染区完成

叶片：在装有取样叶片的研磨袋内加入 1 毫升裂解液，使用剪刀柄或记号笔等在研磨袋外刮擦数次，以充分裂解样品。叶片组织研磨后呈现透明或半透明状态，无明显的大块组织，即可视为样品已充分裂解。

种子：种子样品直接检测时，可将 0.5 克种子放入加有 1 毫升裂解液的研磨袋内，无需破裂种皮。轻轻搓动研磨袋 5 ~ 10 秒后放置 10 秒，再搓动 5 ~ 10 秒，重复上述操作，时长约为 1 分钟，直至研磨液略显浑浊，即可视为样品已充分裂解。种子经萌发后检测，用一次性镊子夹取子叶和嫩茎部分放入研磨袋内，按叶片研磨方式，彻底研磨子叶和嫩茎，即可视为样品已充分裂解。

采集或处理好的样品在 2 ~ 8℃ 条件下保存应不超过 24 小时；若需长期保存，须将采集的样品经液氮速冻后，冻存于 -80℃ 冰箱，但应避免再次冻融。

4. 核酸扩增，污染区完成

(1) 不能打开阴性对照的管盖！按照待检样本，阳性对照的顺序，每份待检样品吸取 5 微升裂解液上清液添加至反应液后，扣紧待检样品反应管管盖。再将 5 微升阳性对照加入阳性检测反应管内，扣紧阳性对照反应管管盖。

(2) 盖好管盖，瞬时离心。使用涡旋振荡器振荡混匀 8 至 10 秒后，瞬时离心（该操作重复 2 至 3 次，确保各组充分混匀），最后瞬时离心收集溶液，即可完成检测反应管的制备。制备完毕的反应管放在提前预热至 39℃ 的恒温仪上反应 16 分钟。

(3) 反应完成后，吸取 5 微升扩增产物至已加入 245 微升超纯水的 1.5 毫升离心管内，做好标记，涡旋混匀。

(4) 单靶标一次性核酸检测试纸条结构示意图如图 2 所示，将试纸条的浸液区端（标示蓝色箭头的一端）插入装有扩增产物稀释物的 1.5 毫升离心管内，液面不得超过浸液区的 MAX 指示线，待判读区全部浸润（约需 60 秒），将试纸平放 1 分钟以上，等待检测线（T 线）出现。根据试纸条显色情况直接读取检测结果。10 分钟内观察结果，10 分钟后判读无效。

(5) 将核酸检测试纸条的浸液区端插入装有扩增产物稀释液的离心管，待判读区全部浸润后，根据试纸条显色情况直接读取检测结果，这一过程约为 3 分钟。

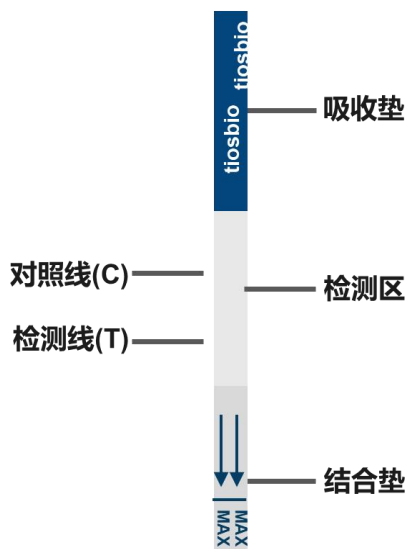


图2 单靶标一次性核酸检测试纸条结构示意图

5. 结果判定

ToBRFV 病毒阴性：阴性对照、被检样品只有蓝色的 C 线显色，红色的 T 线未显色；

ToBRFV 病毒阳性：阳性对照、被检样品蓝色的 C 线和红色的 T 线均显色。T 线呈淡红色，甚至浅粉色条带，被检样品可判定为 ToBRFV 病毒弱阳性。T 线呈红色，甚至为深红色，被检样品可判定为 ToBRFV 病毒强阳性。

无效检测：试纸条不显示蓝色的 C 线，表明操作不当或核酸检测试纸条失效，被检样品该次检测结果无效，需更换试纸条重新检测。

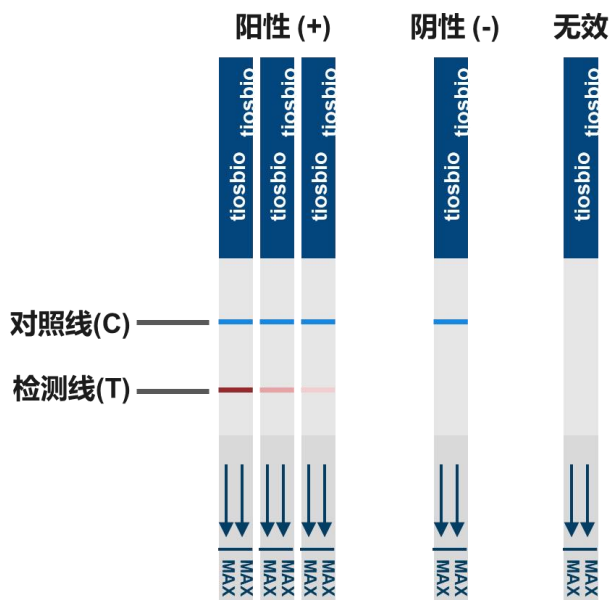


图3 ToBRFV RT RAA-LFS（单靶标）检测结果的解读



注意事项及安全提示：

1. 本产品仅供科研使用。使用前请仔细阅读说明书，严格按照说明书操作。违反或者未按说明书进行操作可能导致错误结果。
2. 产品应依照说明书要求，储存于合适的环境和温度下，并在有效期内使用。储存不当或产品过期可能导致错误结果。
3. 为避免交叉污染、气溶胶污染，无论室内还是室外检测均**应严格按照阴性对照，待检样本，阳性对照的顺序制备反应液！**
4. 所有反应要尽快完成，中间不要停顿。
5. 务必盖紧反应管管盖，避免反应管管盖在混匀或扩增过程中打开。
6. 检测结束后将反应管及时放入密封袋，进行无害化处理。所有检测样本及试剂均按照传染性物质对待，实验过程中应做好工作人员的防护并避免交叉污染。
7. 不能使用过有效期的产品。

基础信息：

生产企业：杭州大鱼探柯生物科技有限公司

地 址：浙江省杭州市西湖区三墩镇灯彩街 1009 号云谷中心 B1 号楼 603-1 室

版 本 号：V1-202601