



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

使用前请仔细阅读说明书

货号: RTF0811

储存条件:

扩增试剂、对照需于-20℃以下避光保存,避免重压和反复冻融,有效期为12个月。裂解液、研磨袋于常温储存。

包装规格: 48T

试剂盒组成:

用途	名称	48次	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	qPCR 2×Buffer	500微升	1管	-20℃
	qPCR 酶	50微升	1管	-20℃
	ToBRFV qPCR 正反向引物	200微升	1管	-20℃
	ToBRFV qPCR 探针引物	50微升	1管	-20℃
对照	ToBRFV 阳性对照	200微升	1管	-20℃
	ToBRFV 阴性对照	500微升	1管	-20℃
说明书	说明书	1份	1份	常温

实验条件配置:

非污染区: 功能包括试剂盒的储存,反应体系的配置,阴性对照的添加。要求空间独立,专用移液枪。

污染区: 功能包括实际样品的裂解,实际模板的添加,阳性对照的添加,试纸条显色。要求空间独立,专用移液枪。

特殊说明: 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。试剂盒中各组分(除阳性对照)不能出现在污染区中。

所有离心振荡混匀的步骤必须严格完成,保证体系混匀。

操作步骤:

1. 反应体系配置,非污染区完成

1) 设所需扩增管数为n(n=样本数+1管阴性对照+1管阳性对照)。从扩增试剂盒中取出阴性对照、阳性对照、qPCR 2×Buffer、qPCR 酶、qPCR 正反向引物、qPCR 探针引物,室温融化后,瞬时离心。按下表,将各组分加入扩增反应管。阴性对照添加4微升阴性对照,优先添加阴性对照后,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。

组分	阴性对照(微升)	待检测样品(微升)	阳性对照(微升)
qPCR 2×Buffer	10	10	10
qPCR 酶	1	1	1
qPCR 正反向引物	4	4	4
qPCR 探针引物	1	1	1
模板	阴性对照 4	裂解液上清液 4 (第三步后添加)	阳性溶液 4 (第三 步后添加)

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的典型症状的植株顶端的新叶叶片样品。取样时,戴好乳胶手套和PE手套,使用8毫米的打孔器对出现疑似病毒感染的植物样品打孔取样。打孔器取样时应避开黄叶和干叶。每次打孔获取的组织量约为20~30毫克,所采组织可直接置于含3毫升裂解液的研磨袋中,或放入

含 1 毫升裂解液的 2 毫升离心管中置于无接触式超声研磨仪进行裂解。该样品裂解方式可用于单孔叶片组织(约 20 ~ 25 毫克)的检测,也支持最多 6 片叶片组织(约 150 毫克)的混合检测(见图 1)。如无打孔器,可在佩戴 PE 手套的条件下,撕取约 0.5 厘米见方的叶片组织作为样品。

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。

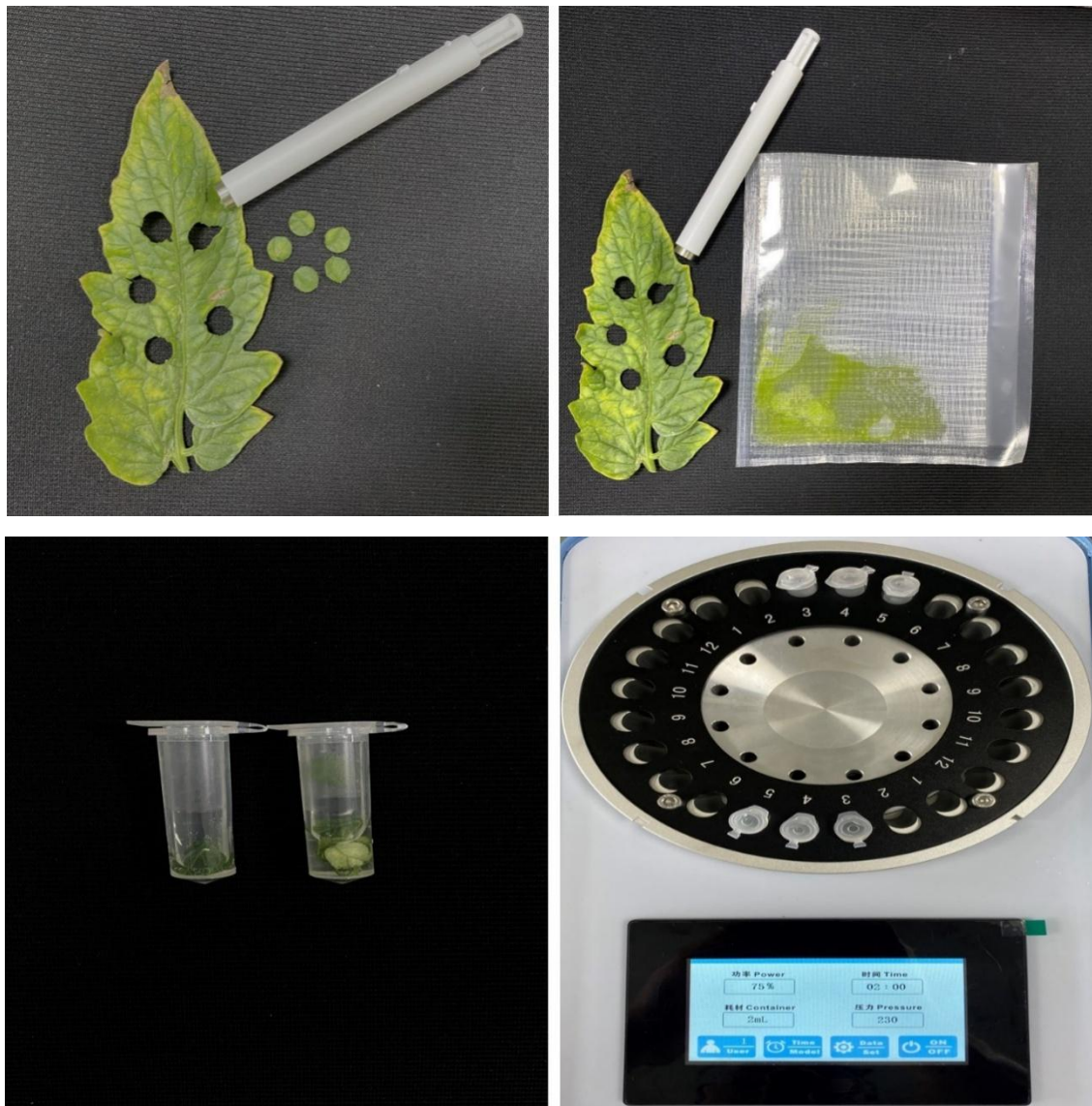


图1 样品的采集与研磨

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 3 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。

使用无接触式超声波研磨仪时,将 1 ~ 6 片叶片组织置于 2 毫升离心管中,加入 1 毫升裂解液后扣紧管盖,将离心管放入超声研磨仪,点击启动键裂解样品。

种子:种子样品直接检测时,可将 0.5 克种子放入加有 2 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。

使用无接触超声波研磨仪,将 30 粒种子置于 2 毫升离心管中,加入 0.5 毫升裂解液后扣紧管盖,静置过夜后,将离心管放入超声研磨仪,点击启动键裂解样品。

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，加入 1 毫升裂解液，彻底研磨子叶和嫩茎，即可视为样品已充分裂解。

使用无接触超声波研磨仪，用一次性镊子夹取子叶和嫩茎部分放入 2 毫升离心管内，加入 1 毫升裂解液后，扣紧管盖，将离心管放入超声研磨仪，点击启动键裂解样品。

采集或处理好的样品在 2 ~ 8 °C 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 °C 冰箱，但应避免再次冻融。

4. 核酸扩增，污染区完成

- 1) 打开待检样本，阳性对照，不能打开阴性对照的管盖。按照待检样本，阳性对照的顺序添加至反应液。
- 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 ~ 3 次，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实时定量 PCR 仪上进行反应。反应程序为 37 °C, 2 min, 52 °C, 5 min, 95 °C, 1 min, 之后 95 °C, 3 sec, 60 °C, 30 sec 共 40 个循环。
- 3) 待反应完成后，观察样品扩增曲线即可。

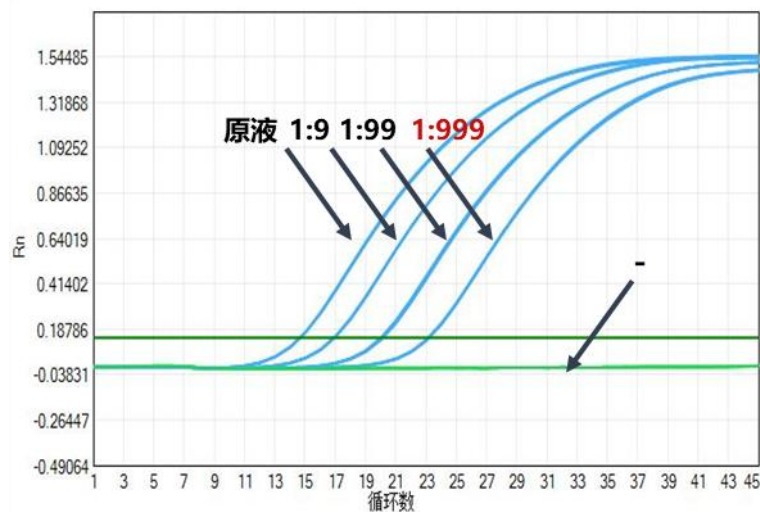


图 2 ToBRFV 感染番茄叶片粗裂解物的梯度稀释物直接检测扩增情况

结果判定：

ToBRFV 病毒阴性：阳性对照扩增曲线正常，阴性对照、被检样品均未出现扩增曲线。

ToBRFV 病毒阳性：阳性对照、被检样品扩增曲线表现正常。如被检样品 CT 值 ≤ 25 可判定为 ToBRFV 病毒强阳性样品； $25 < \text{CT 值} \leq 35$ 可判定为 ToBRFV 病毒阳性样品； $35 < \text{CT 值} \leq 40$ 可判定为 ToBRFV 病毒疑似样品，需要对同一样品进行复测，如复测仍为阳性，该样品可判定为 ToBRFV 病毒阳性。

无效检测：阳性对照未显示扩增曲线，表明操作不当或核酸检测试剂失效，被检样品该次检测结果无效，需更换试剂重新检测。

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. 为避免交叉污染和气溶胶污染，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 PCR 管，避免 PCR 管盖在扩增过程中打开。
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