

旋达[®]R1植物病害检测系列

瓜类果斑病菌核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法 GB 标准）

请于-20℃条件下保存，有效期 15 个月

◆ 产品说明

旋达[®]R1本产品参考《GB/T 36822-2018 瓜类果斑病菌检疫鉴定方法》开发，可针对可能带有瓜类果斑病菌的西瓜、甜瓜等葫芦科作物植株及种子等样品中病原的特异核酸片段进行扩增，通过实时扩增曲线判定结果。本产品用于对瓜类果斑病菌的检测。

◆ 产品组成（48 测试）

092332M	
试剂	含量
A-AC-P	1000μL × 1 支
NG-P	100μL × 2 支
PG-AC-P	100μL × 1 支

◆ 适用仪器

ABI 7500、CFX 96、Mx 3005P、LineGene9600 等实时荧光 PCR 仪。

◆ 自备耗材和仪器

①冰盒；②移液器（0.5-10μL，10-100μL，100-1000μL）及配套灭菌吸头；③离心机；④涡旋混匀器；⑤金属浴；⑥均质机、搅拌机或研钵等研磨器具；⑦电子天平。

◆ 注意事项

1. 本试剂检测灵敏度高。为了防止污染，实验要分区操作。
 - 1) 第一区：试剂准备区。
 - 2) 第二区：样本制备区。
 - 3) 第三区：扩增及产物分析区。
- ★ 分区之间最好进行物理性隔离，避免人为因素造成的污染。
2. 实验过程中穿戴工作服和乳胶手套，不同区域独立使用工具，需更换手套和实验服。
3. 严格按照操作步骤操作，试剂配制和加样等步骤请严格按照说明书要求在冰盒上操作。
4. 反应液中的成分对光敏感，应**避光保存**。试剂使用前要完全解冻，但应避免反复冻融，推荐使用前离心 30 秒，并按检测频次将反应液以适当体积分管保存。
5. 反应结束后，扩增管请置于密封袋内丢弃，当日清理，开盖易造成气溶胶污染，禁止开盖。
6. 不同批号试剂请勿混合使用，在有效期内使用。

◆ 样品处理

植株样品：对于有症状植株，低倍显微镜下观察病健交界处组织有无溢菌现象，若有溢菌现象，选取新鲜的病健交界处组织（对于无症状样品，随机选取植物组织），切成 0.5cm×0.5cm 左右的小块，用 75%的乙醇（或 1%的次氯酸钠）进行表面消毒，晾干，放入装有 1mL 无菌水的 2mL 离心管中，用灭菌玻棒捣碎，制成悬浮液，1000 r/min 离心 1min，弃去沉淀，上清液转入另一干净的 2mL 离心管中。可将 2 份~3 份同一样品的悬浮液合并成一管，最终制成 1mL~2mL 悬浮液，用于分离培养、免疫学检测及分子生物学检测。

种子样品：对于种子样品，根据实验室条件，可利用种植观察法，亦可直接进行免疫学或分子生物学检测。随机抽取待检瓜种 300g 左右，平均分成 3 份~5 份，将种子剥开（如利用灭菌的大号指甲钳刀），或使用微型粉碎机轻微破碎（至 2/3 以上种子破碎），加入适量 pH 7.0 的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液或生理盐水，使种子完全浸没，室温震荡 4 h（100 r/min 左右），4℃浸泡过夜。将浸泡液 1000 r/min 离心 1min，去沉淀，上清液 10000 r/min 离心 10min，弃上清液，取沉淀。用无菌水悬浮，制成 1mL~2mL 样品悬浮液，用于分离培养、免疫学检测以及分子生物学检测。

◆ 实验操作

1. 试剂配制（试剂准备区，放置于冰盒中进行）：

若有 N 个待检样品，则参照下表，按照 N+2 个数量计算反应液用量（N 个待检样品+1 个空白对照 NG+1 个阳性对照 PG-AC-P），涡旋混匀，离心 30s，分装于 PCR 管中。

试剂	使用量
A-AC-P	20×(N+2)μL
反应液总体积	20×(N+2)μL

2. 模板制备（样本制备区）

参照《GB/T 36822-2018 瓜类果斑病菌检疫鉴定方法》进行，或使用合适的商品化核酸提取试剂盒，具体过程详见产品说明书。

3. 添加模板（样本制备区，放置于冰盒上进行）

在步骤 1 中已含有反应液的 PCR 管中分别加入 5μL 模板，顺序为 NG、待测样品模板、PG-AC-P。盖好 PCR 管盖后，涡旋混匀 30s，离心 1min，立即进行 PCR 扩增反应。

4. 扩增反应（扩增及产物分析区）

使用荧光定量 PCR 仪，荧光基团选择 FAM，淬灭基团选择 None。

按下列条件设置扩增反应：

	PCR 循环			荧光收集位点
去污染	50°C	5 分钟	1 个循环	—
预变性	95°C	5 分钟	1 个循环	—
扩增	95°C	15 秒	40 个循环	—
	60°C	30 秒		※

其他仪器请参照仪器说明书进行设置。

5. 基线和阈值设定

基线调整取 3-15 个循环的荧光信号，阈值线应超过空白对照扩增曲线的最高点。

◆ 结果判定

在阳性对照 Ct 值≤34、空白对照 Ct 值≥40 前提下：

如果检测样品的 Ct 值≤35，出现典型扩增曲线，判定为 qPCR 阳性；

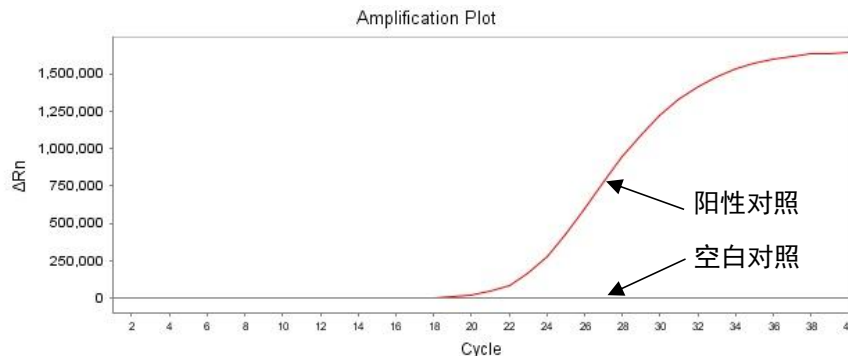
如果检测样品的 Ct 值≥40，不出现典型扩增曲线，判定为 qPCR 阴性；

如果检测样品的 35<Ct 值<40，应重新测试。重新测试后，如果仍然为 35<Ct 值<40，则判定为 qPCR 阳性；

如果 Ct 值≥40，则判定为 qPCR 阴性。

请参照《GB/T 36822-2018 瓜类果斑病菌检疫鉴定方法》进行分离培养鉴定及结果判定。

★ NG 反应为平滑直线，PG 反应为“S”型扩增曲线，此次检测结果有效，否则无效。如重复检测结果仍为无效，请与技术支持人员联系。



参考结果图

◆ 企业信息

广州双螺旋基因技术有限公司

网址：www.dhelix.cn

电话：020-85671013

传真：020-34037175

地址：广州国际生物岛螺旋四路 7 号标准产业单元二期第三栋第三层 302 单元