旋达®R1植物病害检测系列

马铃薯纺锤块茎类病毒 RNA 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 31790-2015 马铃薯纺锤块茎类病毒检疫鉴定方法》开发，可针对可能携带有马铃薯纺锤块茎类病毒的马铃薯组织材料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。本产品适用于马铃薯纺锤块茎类病毒的检测。

◆ 产品组成（48 测试）

092342M	
试剂	含量
A-PSTVd-P	1000μL × 1 支
NG-P	100μL × 2 支
PG-PSTVd-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

参照《GB/T 31790-2015 马铃薯纺锤块茎类病毒检疫鉴定方法》等标准进行样品处理，制备的样本保存待用。详细步骤请按照标准操作。

◆ 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 个数量计算各组分用量（N 个待检样品+1 个空白对照 NG+1 个阳性对照 PG-PSTVd-P），涡旋混匀，离心 30 秒，分装于 PCR 管中。

试剂	使用量
A-PSTVd-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 31790-2015 马铃薯纺锤块茎类病毒检疫鉴定方法》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）

向步骤 1 每管反应液中分别加入 5μL 模板，顺序为 NG、待测样品模板、PG-PSTVd-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
50℃	5 分钟	1 个循环	—
95℃	5 分钟	1 个循环	—
95℃	15 秒	40 个循环	—
60℃	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

在空白对照无 Ct 值且无扩增曲线，阳性对照 Ct 值≤30 并出现典型扩增曲线的条件下：

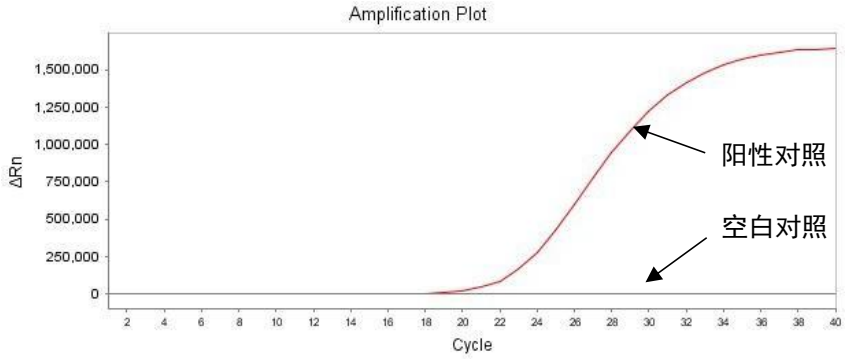
待测样品的 Ct 值≥40，曲线为直线或轻微斜线，无“S”型扩增曲线，可判定马铃薯纺锤块茎类病毒阴性；

待测样品的 Ct 值≤35，曲线呈“S”型扩增曲线，可判定马铃薯纺锤块茎类病毒阳性；

待测样品的 35≤Ct 值≤40，应重新进行测试。如果重新测试的 Ct 值≥40，则可判定马铃薯纺锤块茎类病毒阴性；如果重新测试的 Ct 值＜40，可判定马铃薯纺锤块茎类病毒阳性。

注意，显症马铃薯样品为实时荧光 RT-PCR 阳性，可判定样品携带马铃薯纺锤块茎类病毒，无症马铃薯样品经实时荧光 RT-PCR 检测为阳性，需不同原理的检测方法确认一次，两次结果均为阳性，则判定样品携带马铃薯纺锤块茎类病毒。详细操作请参照《GB/T 31790-2015 马铃薯纺锤块茎类病毒检疫鉴定方法》进行。

★ 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