

旋达[®]R1 植物病害检测系列

黄瓜绿斑驳花叶病毒^{RNA} 核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法 SN 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《SN/T 2344-2014 黄瓜绿斑驳花叶病毒检疫鉴定方法》开发，可针对可能带有黄瓜绿斑驳花叶病毒的植物的种子、苗木及植物产品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。本产品适用于黄瓜绿斑驳花叶病毒的检测。

◆ 产品组成 (48 测试)

092322M	
试剂	含量
A-CGMMV-P	1000μL × 1 支
NG-P	100μL × 2 支
PG-CGMMV-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

- 本试剂检测灵敏度高。为了防止污染，实验要分区操作。
 - 第一区：试剂准备区。
 - 第二区：样本制备区。
 - 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 不同批号试剂请勿混合使用，在有效期内使用。

◆ 样品处理

种子样品制备：挑取畸形、不成熟的种子播于灭菌土中，待长出 3~4 片叶后将表现症状的植株编号，未表现症状的植株分组 (10 株为 1 组) 并编号，采集的叶片分成 2 份，根据需要分别用于后续的试验。也可以挑取畸形、不成熟的种子直接进行酶联测定和分子生物学检测。

苗木：有症状 (如：叶片畸形、花叶、斑驳等) 的苗木编号单独检测。没有症状的分组并编号检测，分组方法及检测方法同上。

植物产品：植物产品有症状的部分 (如：叶片畸形、花叶、斑驳等) 单独编号检测。没有症状或无法观察症状的植物产品，应按比例取样，分组编号，分组方法及检测方法同上。

◆ 实验操作

- 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-CGMMV-P），涡旋混匀，离心 30 秒，分装于 PCR 管中。

试剂	使用量
A-CGMMV-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《SN/T 2344-2014 黄瓜绿斑驳花叶病毒检疫鉴定方法》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-CGMMV-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°C	5 分钟	1 个循环	—
95°C	5 分钟	1 个循环	—
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

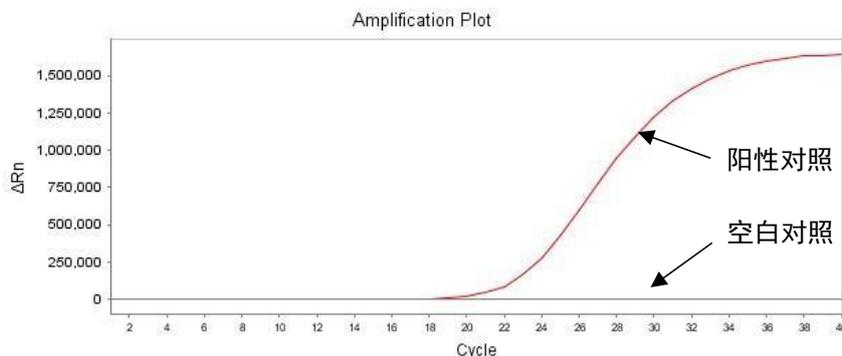
检测样品的 Ct 值大于或等于 40，曲线为直线或轻微斜线，无“S”型扩增曲线，可判定黄瓜绿斑驳花叶病毒阴性；

检测样品的 Ct 值小于或等于 35，曲线呈“S”型扩增曲线，可判定黄瓜绿斑驳花叶病毒阳性；

检测样品的 Ct 值小于 40 而大于 35，应重新进行检测、判定。再次扩增后的样品检测 Ct 值大于或等于 40，则可判定黄瓜绿斑驳花叶病毒阴性；再次扩增后的样品检测 Ct 值小于 40，可判定黄瓜绿斑驳花叶病毒阳性。

注意，最终结果需要结合标准《SN/T 2344-2014 黄瓜绿斑驳花叶病毒检疫鉴定方法》中的其它方法进行判断。

★ 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