

兰花病毒生物芯片 (RE)

(GeneTop Orchid⁵ RE Kit)

使用说明书



巨合生物科技股份有限公司

住址：新竹市中华路四段 504-1 号

手机：+86-15960269083

电话：+86-35381633

传真：+86-35382387



SD-3-UG005 V.2.1

兰花病毒生物芯片快速检测

索引

实验要求	2.
储存条件	2.
产品用途	2.
品质管控	2.
1. 产品内容物	3.
2. 产品特性	4.
3. 设备需求	4.
4. 生物芯片操作流程	5.
5. 实验操作流程.....	5.
A. 核酸 RNA 提取	6.
B. 一步骤反转录聚合酶链所反应	7.
C. 杂合反应	8.
6. 结果判读	9.
生物芯片图标	10.
生物芯片对照表	10.

实验要求

- ✦ 为避免操作污染与干扰，操作人员需全程配戴手套，并使用经高温高压灭菌过的一次性耗材（如：离心管 tube 与吸管尖 tip）
- ✦ 需确实遵照使用手册操作程序操作
- ✦ 生物芯片属于分子生物检测层级，虽拥有优越灵敏度，但是需要注意环境与仪器的清洁，以防止实验交叉污染
- ✦ 切勿混合使用不同批号之试剂
- ✦ 试剂开封后请尽快使用完毕，以免酵素或试剂变质

储存条件

- ✦ 巨合生技兰花病毒快速检测试剂套组（GeneTop Orchid⁵ RE Kit）需依照产品上所标示储存温度正确储存，不可随意放置以确保效能完整
- ✦ 巨合生技之兰花病毒试剂套组，出货后保证有效期限为 8 个月以上（试剂套组自生产制造日期起，保存期限为 1 年）

产品用途

- ✦ 巨合生技兰花病毒检测试剂套组是针对兰花组织内可能感染之病毒，进行高端分子生物原理检测与分析。
- ✦ 本产品无法对于已受感染之兰花植株或组培苗进行治疗与去除病毒。
- ✦ 任何检测试剂都有其检测极限，本产品检测准确度约为 95% 以上

品质管控

- ✦ 巨合生技兰花病毒检测试剂套组于出厂前，已经过多重的品管检测与质量把关，于每一次出货前会再次以实验验证功能性，并附上该试剂套组出货前之品管报告以供客户参考。

1. 产品内容物

包装与规格:

RNA 萃取试剂套组		
名称	数量	体积
Rapid EB I	1 瓶	100 mL
Rapid EB II	1 瓶	100 mL
储存温度：室温储存		

RT-PCR 试剂套组		
名称	数量	体积
TORM ⁵	2 管	1.2 mL
Taq	2 管	40 µL
RT	2 管	28 µL
储存温度：储存于冷冻-18 °C 以下		

杂合反应试剂套组		
名称	数量	体积
HA Buffer	1 瓶	24 mL
B Buffer	1 瓶	25 mL
Strep-AP	1 管	25 µL
(储存于冷冻-18 °C 以下)		
NBT/BCIP	1 管	0.2 mL
C Buffer	1 瓶	80 mL
Wash Buffer	2 瓶	200 mL
(储存于室温)		
GeneTop Orchid ⁵ 芯片	25 条	8 反应/条
96 孔盘胶膜	3 片	-
研磨袋	1 包	210 个
说明书	1 本	
储存温度：冷藏 4°C		

注意事项

- ✦ 试剂套组中的酵素 Taq (红管) 与 RT (蓝管), 因对于温度较为敏感, 因此使用时请尽量置于冰盒中保存, 使用完毕立即放回冷冻温度保存
- ✦ Wash buffer 在低温的状况下偶尔会有白色结晶物体析出乃属正常现象, 若有发现沉淀物析出的现象, 请将试剂置于 50°C 中隔水加热数分钟即可

2. 产品特性

Orchid Virus⁵ RE Kit 可使兰花业者在进行组培大量生产前, 针对兰花常见五种兰花病毒: 东亚兰嵌纹病毒(CymMV)、齿舌兰轮斑病毒(ORSV)、番椒黄化病毒(CaCV)、胡瓜嵌纹病毒 (CMV) 与蝴蝶兰黄化斑点病毒(PhCSV), 进行快速且精准的检测, 亦能有效避免 ELISA 检测中病毒空窗期所产生漏检之情形, 以利确实掌控兰花生产之质量, 避免因遭受病毒感染造成之损失

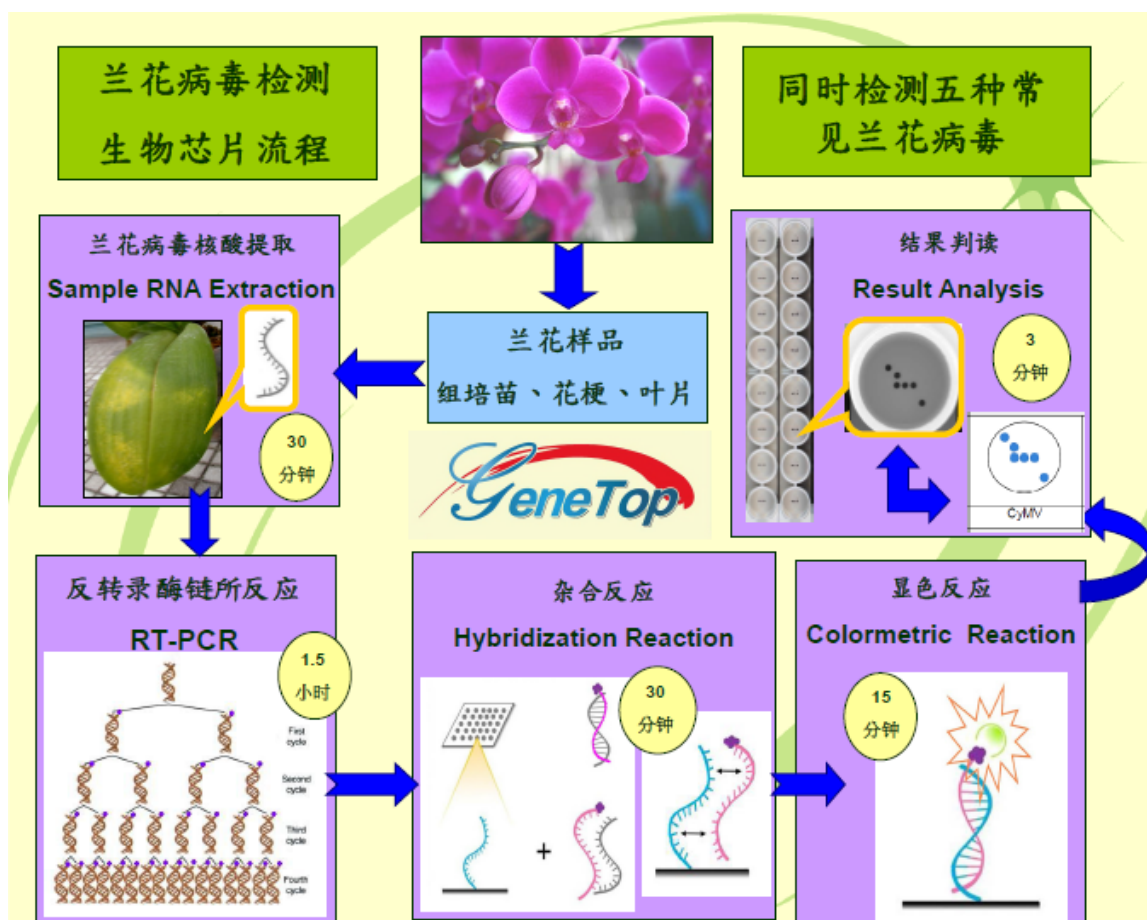
本公司针对兰花病毒中的核酸进行分子生物检测, Orchid Virus⁵ RE Kit 利用三种主要的分子生物学方法来进行植物病毒检测, 包括病毒核酸萃取 (Viral RNA Extraction)、一步骤核酸反转录聚合酵素链锁反应 (One Step Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, **One-Step RT-PCR**), 以及核酸杂合反应 (**Hybridization**), 同时使用非放射性之化学呈色方法进行显色。

- ✦ 此检测试剂套组适合各种检测样品, 包含兰花组培组织、成花之叶片、花梗、花瓣与气根等

3. 设备需求

仪器 (不包含在试剂套组中)	耗材 (不包含在试剂套组中)
✦ 杂合反应仪 ✦ 震荡混合机 ✦ PCR 仪 ✦ 影像扫描分析仪 (选用) ✦ 离心机 ✦ 洗板机 (选用) ✦ -18°C 冷冻冰盒 ✦ 移液枪 ✦ 96 孔冰盒	✦ 1.5mL RNase-free 离心管 ✦ 抛弃式 RNase-free 吸管尖 ✦ RNase-free PCR 操作管

4. 生物芯片操作流程图



5. 实验操作流程

步骤一、病毒核酸快速提取：

利用试剂将兰花组织中之细胞打破，藉以提取病毒之核酸 RNR

步骤二、RT-PCR：

经由 PCR 仪器将病毒生物讯号扩增成 2^{30} 倍

步骤三、杂合反应：

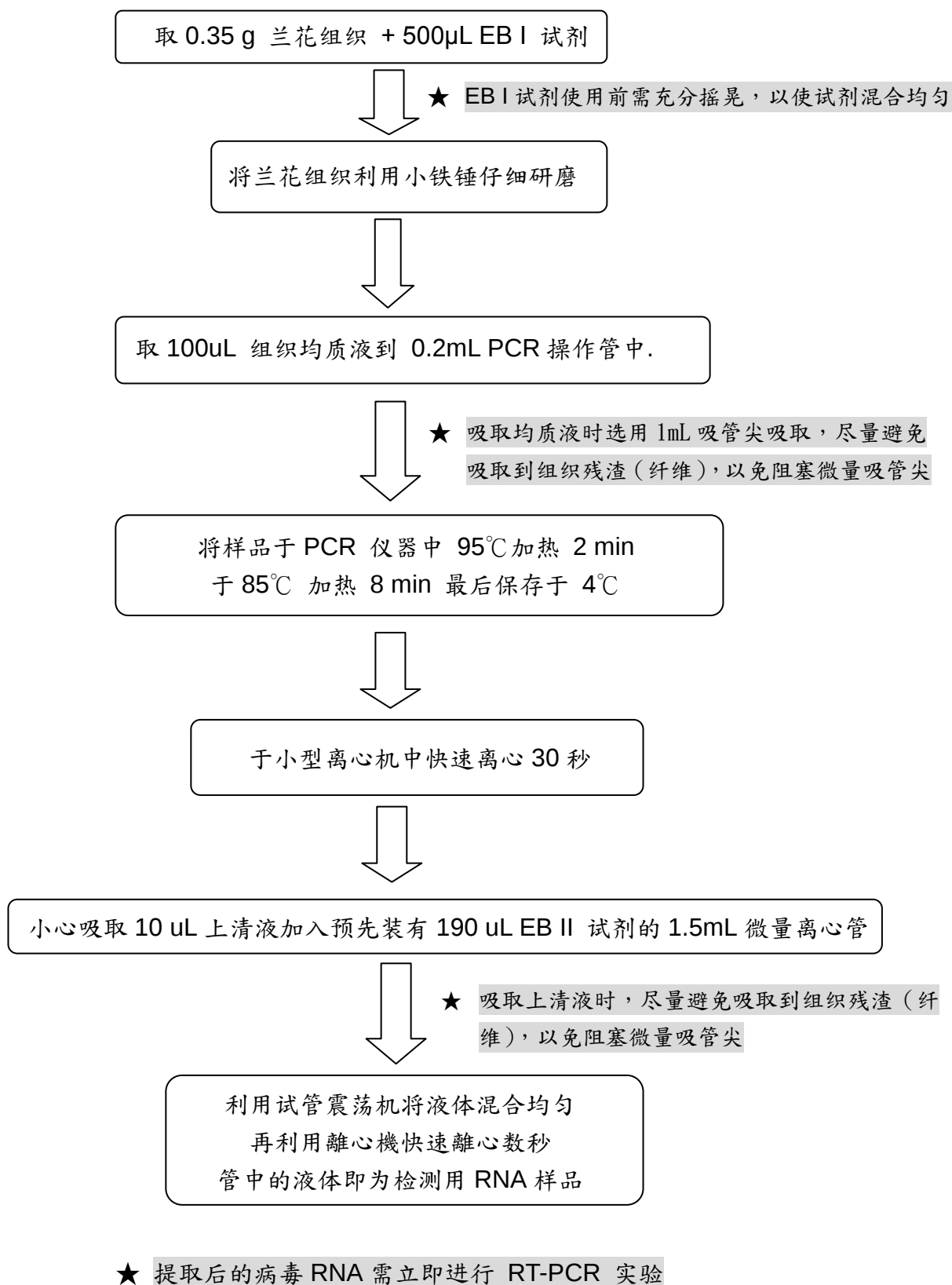
利用芯片上之特异性探针撷取病毒讯号，用以鑑定检测结果

步骤四、结果判读：

利用肉眼或判读仪直接进行生物芯片结果判读

A. RNA 萃取

准备欲检测样品数量之全新 1.5 mL 微量离心管并加入 190 μ L Rapid EB II buffer



B. 一步骤反转录聚合酶链所反应 (RT-PCR)

☆ 配製 RT-PCR 混合試劑前要注意以下幾點：

1. TORM⁵ 使用前要先溶解，並且在使用前震盪混合均勻及離心數秒
2. Taq 及 RT 必須保存在冰盒上，並且在使用前須先離心數秒後保持站立

备注：

1. 由于 Taq 及 RT 所需数量很微量，要注意是否有吸取到液体
2. 吸取 Taq 及 RT 时，必须确认已加入 TORM⁵ 中并混合均匀
3. 配制顺序需由体积较大的先行配制 (TORM⁵→Taq→RT)

TORM⁵ + Taq (紅) + RT (藍) + 樣品 RNA

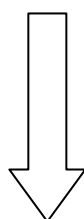


	TORM ⁵	Taq (紅)	RT (藍)	Total volume
体积 (uL)	10	0.15	0.1	10.25
配制数量	× (n + 1)	× (n + 1)	× (n + 1)	× (n + 1)

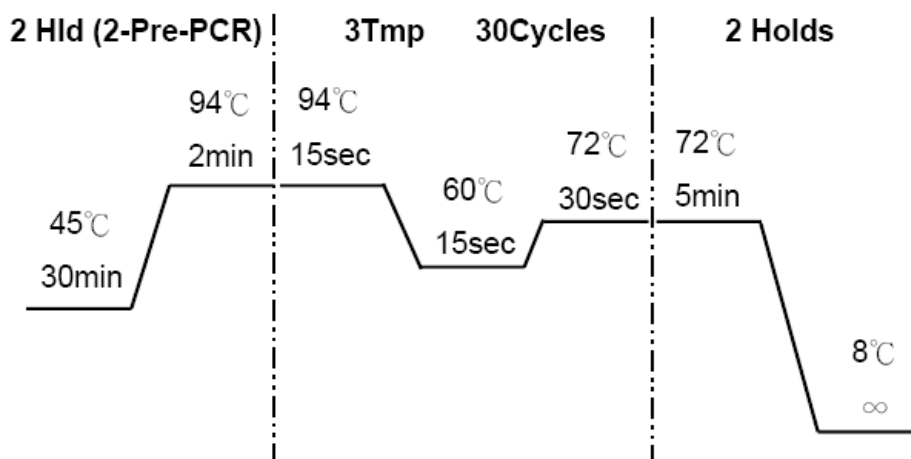
1. 利用上表来配制所需的RT-PCR混合试剂

★ 为了避免分装时的误差，当样品数目多时可多配制1-2个反应

★ “n” = 检测样品数量



2. 將上列 3 種試劑利用震盪機 (Vortex) 混合均勻
3. 吸取 10μL 分別分裝到 PCR 操作管中
4. 分別加入 2μL RNA 樣品到 RT-PCR 混合液中



C. 杂合反应

※操作前先将 HA. Buffer、B Buffer、C Buffer 及 Wash Buffer 回温至室温

★ HA. Buffer 使用前需轻轻摇晃混合均匀

※打开杂合烘箱
并预热至 45℃

将 RT-PCR 产物于 PCR 反应仪中 95℃ 加热作用 3 分钟 30 秒, 等反应仪降温至 4℃ 后, 取出并置于冷冻保温盒中备用

★离心数秒

取 100 μ L HA Buffer 至生物芯片中, 随后加入 10 μ L RT-PCR 产物 (RT-PCR 产物加到 HA Buffer 中, 利用 pipette 混合均匀), 最后贴上胶膜

★将生物芯片放置 45℃ Shaker 中
1000rpm 反应 30 分钟

倒掉杂合反应液, 加入 200 μ L Wash Buffer 清洗 2 次, 最后一次静置 1 分

★倒掉 Wash Buffer, 并于擦手纸上拍干

★同时配制 Blocking Reagent 与 Detection Reagent (参见左表), 混合均匀

★将 Detection Reagent 先避光备用

<Blocking Reagent 配制表>

Strip		1	2	3	4
Blocking	B Buffer	1000	2000	3000	3500
Reagent	Strep-AP	1	2	3	3.5
Strip		5	6	7	8
Blocking	B Buffer	4500	5500	6000	7000
Reagent	Strep-AP	4.5	5.5	6	7
Strip		9	10	11	12
Blocking	B Buffer	7500	8500	9500	10000
Reagent	Strep-AP	7.5	8.5	9.5	10

100 μ L B buffer + 0.1 μ L Strep-AP (1000: 1)
(每个反应所需用量)

取 100 μ L Blocking Reagent 混合液加入生物芯片

★将生物芯片静置 45℃ Shaker 中
(1000 rpm) 反应 5 分钟

倒掉反应液, 以 200 μ L Wash Buffer 清洗 1 次

★倒掉 Wash Buffer,

<Detection Reagent 配制表>

Strip		1	2	3	4
Detection	C Buffer	1000	2000	3000	3500
Reagent	NBT/BCIP	10	20	30	35
Strip		5	6	7	8
Detection	C Buffer	4500	5500	6000	7000
Reagent	NBT/BCIP	45	55	60	70
Strip		9	10	11	12
Detection	C Buffer	7500	8500	9500	10000
Reagent	NBT/BCIP	75	85	95	100

100 μ L C buffer + 1 μ L NBT/BCIP (100: 1)
(每个反应所需用量)

并且加入 100 μ L C Buffer 润湿后, 静置 1 分钟, 倒掉并于擦手纸上拍干

取 100 μ L Detection Reagent 呈色混合液加入生物芯片中

★将生物芯片放置 45℃ Shaker 中 (0 rpm), 反应 7 分钟

倒掉反应液, 并以大量自来水清洗测试盘

于 45℃ 干燥, 并且判读结果

Blocking reagent:

★ Strep-AP : B Buffer = 1 : 1000

试剂	体积 (uL)	配制数量
B Buffer (浅蓝色)	100	× n+1
Strep-AP (透明管)	0.1	× n+1
总体积	100× n+1	

Detection reagent:

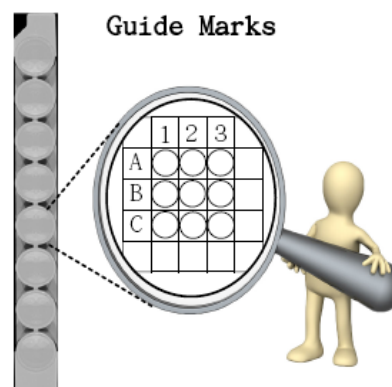
★ NBT/BCIP : C Buffer = 1 : 100

试剂	体积 (uL)	配制数量
C Buffer (浅绿色)	100	× n+1
NBT/BCIP (棕色)	1	× n+1
总体积	100× n+1	

6. 结果判读

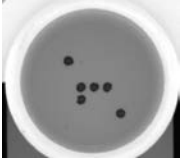
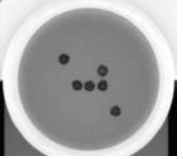
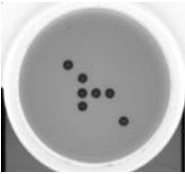
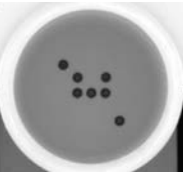
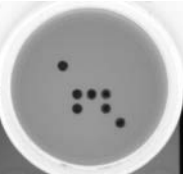
生物芯片矩阵图

B2	D2	B4	D4
<i>CymMV</i>	<i>ORSV</i>	<i>CaCV</i>	<i>CMV</i>
D3	C3	A1、C2、 C4、E5	-
<i>PhCSV</i>	RT-PCR 阳性控制点	杂合反应阳性控制点	-

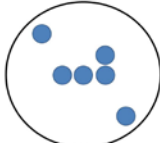
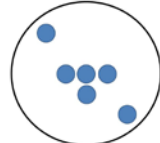
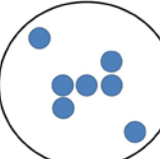
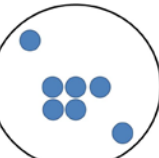
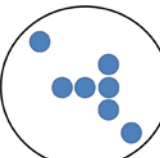
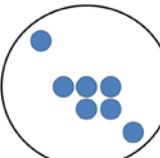


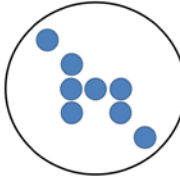
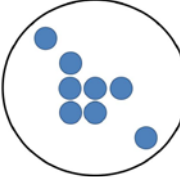
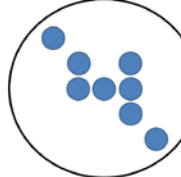
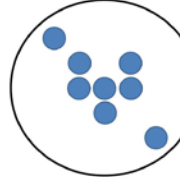
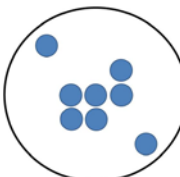
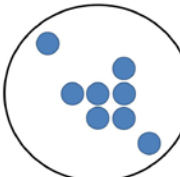
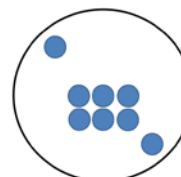
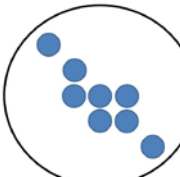
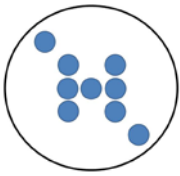
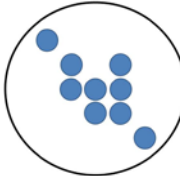
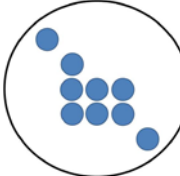
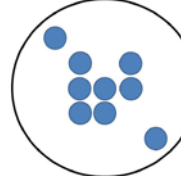
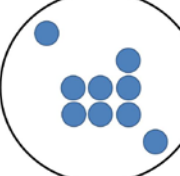
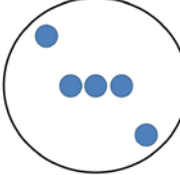
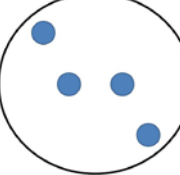
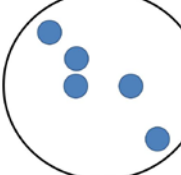
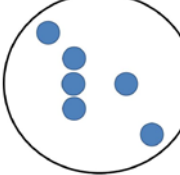
A1	A2	A3	A4	A5
B1	B2	B3	B4	B5
C1	C2	C3	C4	C5
D1	D2	D3	D4	D5
E1	E2	E3	E4	E5

生物芯片图标：

单一病毒感染				
				
CyMV	ORSV	CaCV	CMV	PhCSV
复合性感染				阴性反应
				
CyMV+ORSV	CyMV+CaCV	ORSV+CMV	五种病毒感染	健康样品

生物芯片对照表：

单一病毒感染				
				
CyMV	ORSV	CaCV	CMV	PhCSV
复合性感染（两种病毒）				
				
Cy+OR	Cy+Ca	Cy+CM	Cy+Ph	OR+Ca
复合性感染（两种病毒）				
				
OR+CM	OR+Ph	Ca+CM	Ca+Ph	CM+Ph

复合性感染（三种病毒）				
				
Cy+OR+Ca	Cy+OR+CM	Cy+OR+Ph	Cy+Ca+CM	Cy+Ca+Ph
复合性感染（三种病毒）				
				
OR+Ca+CM	OR+Ca+Ph	Ca+CM+Ph	OR+Ph+CM	Cy+Ph+CM
复合性感染（四种病毒）				
				
Cy+OR+Ca+CM	Cy+Ph+Ca+CM	Cy+OR+Ph+CM	Cy+OR+Ca+Ph	OR+Ca+Ph+CM
五种病毒感染	阴性反应	残缺的 RT-PCR 阳性控制点		
				
Cy+OR+Ca+CM+Ph	健康样品	无效数据（注 1）	有效数据（注 2）	

注一：当RT-PCR阳性控制点有所缺失，且无其他病毒检测讯号存在时，需将此实验结果判为无效数据，并重新采样检测

注二：当RT-PCR阳性控制点有所缺失，但是有其他病毒检测讯号存在时，此实验结果可归类为有效数据，可依照病毒感染情形直接判读

