

### 禽正呼肠孤病毒探针法荧光定量RT-PCR试剂盒说明书

试剂盒简介为了适应禽正呼肠孤病毒探针法荧光定量RT-PCR试剂盒快速检测和疫病研究的需要，本公司参照 OIE 国际标准中规定的引物序列，经多次实验及系统优化，开发生产了本试剂盒。应用本试剂盒进行检测具有快速、灵敏、特异、准确、安全操作简单、应用广泛和高通量检测等特点及优点。

#### 样本处理及要求：

1. 血清：全血标本请于室温放置2小时或4℃过夜后于1000g离心20分钟，取上清即可检测，或将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
2. 血浆：可用EDTA或肝素作为抗凝剂，标本采集后30分钟内于2 - 8℃ 1000g离心20分钟，或将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。
3. 组织匀浆：用预冷的PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液（匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果），称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的PBS（一般按1:9的重量体积比，比如1g的组织样品对应9mL的PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂）加入玻璃匀浆器中，于冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，或反复冻融。将匀浆液于5000×g离心5~10分钟，取上清检测。
4. 细胞培养物上清或其它生物标本：1000g离心20分钟，取上清即可检测，或将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

#### 试剂盒组成及试剂配制：

1. 酶联板 (Assay plate )：一块 (96孔)。
2. 标准品 (Standard)：2瓶 (冻干品)。
3. 样品稀释液 (Sample Diluent)：1×20ml/瓶
4. 生物素标记抗体稀释液 (Biotin-antibody Diluent)：1×10ml/瓶。
5. 辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液 (HRP-avidin Diluent)：1×10ml/瓶。
6. 生物素标记抗体 (Biotin-antibody)：1×120 μ l/瓶 (1: 100)
7. 辣根过氧化物酶标记亲和素 (HRP-avidin)：1×120 μ l/瓶 (1: 100)
8. 底物溶液 (TMB Substrate)：1×10ml/瓶。
9. 浓洗涤液 (Wash Buffer)：1×20ml/瓶，使用时每瓶用蒸馏水稀释25倍。
10. 终止液 (Stop Solution)：1×10ml/瓶 (2N H2SO4)。

#### 反应五要素：

参加PCR反应的物质主要有五种即引物、酶、dNTP、模板和Mg<sup>2+</sup>

引物：引物是PCR特异性反应的关键，PCR 产物的特异性取决于引物与模板DNA互补的程度。理论上，只要知道任何一段模板DNA序列，就能按其设计互补的寡核苷酸链做引物，利用PCR就可将模板DNA在体外大量扩增。设计引物应遵循以下原则：

- ①引物长度：15-30bp，常用为20bp左右。
- ②引物扩增跨度：以200-500bp为宜，特定条件下可扩增长至10kb的片段。
- ③引物碱基：G+C含量以40-60%为宜，G+C太少扩增效果不佳，G+C过多易出现非特异条带。ATGC\*随机分布，避免5个以上的嘌呤或嘧啶核苷酸的成串排列。
- ④避免引物内部出现二级结构，避免两条引物间互补，特别是3'端的互补，否则会形成引物二聚体，产生非特异的扩增条带。
- ⑤引物3'端的碱基，特别是最末及倒数第二个碱基，应严格要求配对，以避免因末端碱基不配对而导致PCR失败。
- ⑥引物中有或能加上合适的酶切位点，被扩增的靶序列\*有适宜的酶切位点，这对酶切分析或分子克隆很

有好处。

⑦引物的特异性：引物应与核酸序列数据库的其它序列无明显同源性。

引物量：每条引物的浓度0.1~1 $\mu$ mol或10~100pmol，以\*引物量产生所需要的结果为好，引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增，且可增加引物之间形成二聚体的机会。

**操作流程：**

1. 从室温平衡20min后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回4℃。
2. 设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品50  $\mu$  L；
3. 样本孔中加入待测样本50  $\mu$  L；空白孔不加。
4. 除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体100  $\mu$  L，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育60min。
5. 弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液（350  $\mu$  L），静置1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板5次（也可用洗板机洗板）。
6. 每孔加入底物A、B各50  $\mu$  L，37℃避光孵育15min。
7. 每孔加入终止液50  $\mu$  L，15min内，在450nm波长处测定各孔的OD值。

**样本：**血清 血浆 组织匀浆等液体样本

**标记物：**血清 血浆 组织匀浆等

**应用：**仅用科研实验检测定量，定性检

**检测方法：**夹心法

**技术要求：**全程按说明书步骤检测，操作规范，专业，仪器设备齐全。

**规格：**48t/96t

**性状：**液体

**运输方式：**快递发货

**有效期：**6个月品

**特点：**灵敏性高，一一性，吸附均匀，吸附性好，回收利用率高，是一款可以让您放心选购的产品。

**使用范围：**此产品供科研实验使用，不得用于一一。

**用途：**用于测定人血清、血浆、组织及相关液体样本中的含量或活性。

**注：**本公司提供试剂盒免费代测服务。需要其他检测试剂盒请咨询销售人员。