

## 刚果嗜皮菌染料法荧光定量 PCR 试剂盒说明书

试剂盒简介 为了适应刚果嗜皮菌染料法荧光定量 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。

### 2、试剂盒组成:

试剂盒组成包括核酸提取试剂和核酸扩增试剂, 具体组成参见表 1: s

表 1: 试剂盒组成 (50test/盒)

组成成分	体积
样品 DNA 提取液1	5ml×1 管
样品 DNA 提取液2	500μl×1 管
核酸扩增试剂: DEPC 水	5ml×1 管
BP PCR 反应液	750μl×1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl×1 管
阴性对照	1ml×1 管
BP 阳性对照	1ml×1 管

### 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° C 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 μl/瓶 (1: 100)

7. 辣根过氧化物酶标记亲和素 (HRP-avidin) : 1×120 μl/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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 。

### 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 0.1~1μmol 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 μL;
3. 样本孔中加入待测样本 50 μL; 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 μL, 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 μL), 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 μL, 37℃避光孵育 15min。
7. 每孔加入终止液 50 μL, 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，---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---。

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。