

### 猪流行性腹泻病毒染料法荧光定量 RT-PCR 试剂盒说明书

1、试剂盒简介 为了适应猪流行性腹泻病毒染料法荧光定量 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。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/μl)   | 40μl×1 管  |
| 阴性对照           | 1ml×1 管   |
| BP 阳性对照        | 1ml×1 管   |

试剂盒组成及试剂配制：

酶联板（Assay plate）：一块（96 孔）。

- 标准品（Standard）：2 瓶（冻干品）。
- 样品稀释液（Sample Diluent）：1×20ml/瓶。
- 生物素标记抗体稀释液（Biotin-antibody Diluent）：1×10ml/瓶。
- 辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液（HRP-avidin Diluent）：1×10ml/瓶。
- 生物素标记抗体（Biotin-antibody）：1×120 μl/瓶（1：100）。
- 辣根过氧化物酶标记亲和素（HRP-avidin）：1×120 μl/瓶（1：100）。
- 底物溶液（TMB Substrate）：1×10ml/瓶。
- 浓洗涤液（Wash Buffer）：1×20ml/瓶，使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。
- 终止液（Stop Solution）：1×10ml/瓶（2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>）。

样本处理及要求：

- 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。
- 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。
- 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。

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。

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。

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。