

钩端螺旋体通用染料法荧光定量PCR试剂盒说明书

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 H₂SO₄)。

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。

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。

PCR反应的特异性决定因素为:

1. 引物与模板DNA特异正确的结合。
2. 碱基配对原则。
3. Tag DNA聚合酶合成反应的忠实性。
4. 靶基因的特异性与保守性。

其中引物与模板的正确结合是关键。引物与模板的结合及引物链的延伸是遵循碱基配对原则的。聚合酶合成反应的忠实性及 Tag DNA聚合酶耐高温性, 使反应中模板与引物的结合 (复性) 可以在较高的温度下进行, 结合的特异性大大增加, 被扩增的靶基因片段也就能保持很高的正确度。再通过选择特异性和保守性高的靶基因区, 其特异性程度就更高。

PCR实验步骤:

- ①产品仅用于科研取冻存已裂解的细胞, 室温放置5分钟使其完全溶解。
- ②两相分离 每1ml的TRIZOL试剂裂解的样品中加入0.2ml的1vfang, 盖紧管盖。手动剧烈振荡管体15秒后, 15到30℃孵育2到3分钟。4℃下12000rpm离心15分钟。离心后混合液体将分为下层的红色酚1vfang相, 中间层以及无色水相上层。RNA全部被分配于水相中。水相上层的体积大约是匀浆时加入的TRIZOL试剂的60%。

③RNA沉淀 将水相上层转移到一干净无RNA酶的离心管中。加等体积异丙醇混合以沉淀其中的RNA，混匀后15到30℃孵育10分钟后，于4℃下12000rpm 离心10分钟。此时离心前不可见的RNA沉淀将在管底部和侧壁上形成胶状沉淀块。

④RNA清洗 移去上清液，每1mlTRIZOL试剂裂解的样品中加入至少1ml的75%乙醇(75%乙醇用DEPCH20配制)，清洗RNA沉淀。混匀后，4℃下7000rpm离心5分钟。

⑤RNA干燥 小心吸去大部分乙醇溶液，使RNA沉淀在室温空气中干燥5-10分钟。

⑥溶解RNA沉淀 溶解RNA时，先加入无RNA酶的水40 μ l用枪反复吹打几次，使其完全溶解，获得的RNA溶液保存于-80℃待用。 1)紫外吸收法测定先用稀释用的TE溶液将分光光度计调零。然后取少量RNA溶液用TE稀释(1:100)后，读取其在分光光度计260nm和280nm处的吸收值，测定RNA溶液 浓度和纯度。