

鼠疫耶尔森菌(鼠疫杆菌)探针法荧光定量 PCR 试剂盒说明书

1、试剂盒简介 为了适应鼠疫耶尔森菌(鼠疫杆菌)探针法荧光定量 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

样本采集、存放及运输:

- 1、样本采集: 各类型样本按照常规方法采集;
- 2、存放: 样本在 2~8℃ 条件下保存应不超过 72h, -70℃ 以下可长期保存, 但应避免反复冻融 (zui 多冻融 3 次);
- 3、运输: 采用泡沫箱加冰密封进行运输。

试剂盒组成及试剂配制:

- 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)。

样本采集、存放及运输:

- 1、样本采集: 各类型样本按照常规方法采集;
- 2、存放: 样本在 2~8℃ 条件下保存应不超过 72h, -70℃ 以下可长期保存, 但应避免反复冻融 (zui 多冻融

3次)；

3、运输：采用泡沫箱加冰密封进行运输。

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，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。

注意事项：

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用，酶标包被板开封后如未用完，板条应装入密封袋中保存。浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，洗涤时不影响结果。
2. 各步加样均应使用加样器，并经常校对其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。
3. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如标本中待测物质含量过高（样本 OD 值大于标准品孔 di 一孔的 OD 值），请先用样品稀释液稀释一定倍数（n 倍）后再测定，计算时请最后乘以总稀释倍数（ $\times n \times 5$ ）。
4. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。
5. 底物请避光保存。
6. 严格按照说明书的操作进行，试验结果判定必须以酶标仪读数为准。
7. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。
8. 本试剂不同批号组分不得混用。
9. 不能使用过期产品。
10. 如与英文说明书有异，以英文说明书为准。

每个样品测试反应体系配制见下表 2。

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	PCR 反应液	Taq 酶	合计
用量	14.5 μL	0.5 μL	15 μL

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. Taq 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 Taq 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。

