

## 庚型肝炎病毒PCR试剂盒说明书

试剂盒简介 为了适应庚型肝炎病毒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、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° 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。

### 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。

### 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。