

腺病毒通用染料法荧光定量 PCR 试剂盒说明书

1、试剂盒简介 为了适应腺病毒通用染料法荧光定量 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

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 H2SO4)。

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；
- ③Taq 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。

(2) 灵敏度高

PCR 产物的生成量是以指数方式增加的，能将皮克 (pg=10⁻¹²g) 量级的起始待测模板扩增到微克 (ug=10⁻⁶g) 水平。能从 100 万个细胞中检出一个靶细胞；在病毒的检测中，PCR 的灵敏度可达 3 个 RFU (空斑形成单位)；在细菌学中 zuì 小检出率为 3 个细菌。

(3) 简便、快速

PCR 反应用耐高温的 Taq DNA 聚合酶，一次性地将反应液加好后，即在 DNA 扩增液和水浴锅上进行变性-退火-延伸反应，一般在 2~4 小时完成扩增反应。扩增产物一般用电泳分析，不一定要用同位素，无放射性污染、易推广。

(4) 对标本的纯度要求低

不需要分离病毒或细菌及培养细胞，DNA 粗制品及总 RNA 均可作为扩增模板。可直接用临床标本如血液、体腔液、洗嗽液、毛发、细胞、活 PCR 技术概论。

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。

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

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。

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（×n×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

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。