

牛呼肠孤病毒探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒说明书

1、试剂盒简介 为了适应牛呼肠孤病毒探针法荧光定量 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、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

特点优势：

1. 特异性：所有产品使用的引物均经过详尽的生物信息学分析，经过 TIANDZ 及自建庞大数据库的比对，确保所用的每一条引物均为种属或血清型特异的基因序列区段，可实现对细菌种属及血清型的特异检测，特异性均达到 100%。

2. 重现性：该系列所有产品均经过大量实验菌株的验证，重现性为 100%。

3. 灵敏性：该系列产品可实现对检测菌的高灵敏检测，当样品中细菌的浓度达到 10³cfu/ml 时，可实现对其的直接检测，无需繁琐的增菌过程。

4. 实用性：检测范围广，涵盖了对人体危害较为严重的 17 种呼吸道及肠道致病菌，可实现对临床样品及其他环境取样的快速检测，整个检测过程为 3-4 个小时。

5. 优势 1：序列资源丰富，除 TIANDZ 公布的序列外，公司还进行了大量菌株的序列破译，从理论上保证所选引物具有良好的保守性和特异性。

6. 优势 2：该系列试剂盒均经过大量的保守性及特异性实验验证，凭借公司拥有的丰富的菌种资源，每一种检测试剂盒均经过了 20 余种标准菌株和临床菌株的保守性验证及 40 余种近缘标准菌株和临床菌株的特异性验证，确保在使用过程中不会出现任何的假阳性及假阴性报告结果。

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 $5000\times g$ 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°C 或 -80°C 保存，但应避免反复冻融。

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)。

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°C 。
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°C 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°C 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。

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

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。