

## 人鼻病毒通用探针法荧光定量 RT-PCR 试剂盒说明书

1、试剂盒简介 为了适应人鼻病毒通用探针法荧光定量 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、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：

酶联板 (Assay plate )：一块 (96 孔)。

- 标准品 (Standard)：2 瓶 (冻干品)。
- 样品稀释液 (Sample Diluent)：1×20ml/瓶
- 生物素标记抗体稀释液 (Biotin-antibody Diluent)：1×10ml/瓶。
- 辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液 (HRP-avidin Diluent)：1×10ml/瓶。
- 生物素标记抗体 (Biotin-antibody)：1×120 μl/瓶 (1: 100)
- 辣根过氧化物酶标记亲和素 (HRP-avidin)：1×120 μl/瓶 (1: 100)
- 底物溶液 (TMB Substrate)：1×10ml/瓶。
- 浓洗涤液 (Wash Buffer)：1×20ml/瓶，使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。
- 终止液 (Stop Solution)：1×10ml/瓶 (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。

### 样本采集、存放及运输：

- 样本采集：各类型样本按照常规方法采集；
- 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)；
- 运输：采用泡沫箱加冰密封进行运输。

### PCR 反应的特异性决定因素为

- 引物与模板 DNA 特异正确的结合。
- 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。

#### 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  $\mu$  L;
3. 样本孔中加入待测样本 50  $\mu$  L; 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  $\mu$  L, 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  $\mu$  L), 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  $\mu$  L, 37℃ 避光孵育 15min。
7. 每孔加入终止液 50  $\mu$  L, 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 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$