**戈氏放线菌PCR试剂盒说明书**

产品名称：**戈氏放线菌PCR试剂盒**

产品规格：50T

原理是由一对引物介导，能在动植物体外对特定基因(DNA)片断进行快速酶促扩增，经过n个热循环扩增，扩增产物中所含特定基因数是原始模板数的(1+E)n(0＜E＜1,扩增效率＝倍，使得检测扩增产物中的特定基因成为可能。产品仅用于科研实验

特异性强

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。

产品特点：

本产品就是根据保守区设计引物而开发的高灵敏荧光定量 PCR 产品。

具有下列特点：

1.根据 指标的保守序列设计的专一性引物，与相关病毒无交叉反应。

2.灵敏度比常规 PCR 高 2-3 个数量级，可以达到几百拷贝/反应。

3.即开即用，用户只需要提供样品模板，操作简单，定量准确快速。

4.一管式荧光定量 PCR 检测，避免后续污染。

5.本试剂盒足够 50 次 20μL 反应体系的荧光定量 PCR。

6.本产品只适用于科研，不能用于临床诊断。

规格及成分 成分

 2×qPCR MagicMix 500 μL（装 A 袋）

微量核酸稀释液（荧光 PCR 专用）1 mL（装 A 袋）

PCR 引物混合物 100 μL（装 A 袋）

基因阳性对照 50 μL（装 B 袋）

DNA 病毒裂解液（试用装） 15 次（9 mL）

使用手册 1 份

运输及保存：低温运输、-20℃保存(A 袋试剂放样品准备区、B 袋的阳性对照最好分开放置)，

自备试剂DNA 模板、10×ROX（根据机型决定，具体见使用方法）。

应用案例

样品 DNA 的制备

1.用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数病毒 DNA 提取试剂盒兼 容。。也可以选购本公司的一管式病毒 DNAout 或其升级版柱式病毒 DNAout。 本试剂盒免费赠送 15 次 DNA 病毒裂解液试用装（一管式病毒 DNAout 的成分）。

稀释阳性对照（以 10E2-10E7 这 6 个 10 倍稀释度为例。由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分）。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供可以直接使用的长为 86bp 的 DNA 片段作为阳性对照。

2.标记 6 个离心管，分别为 7，6，5，4，3，2。

3.用带芯枪头分别加入 45 μL 模板稀释液（最好用带芯枪头，下同）。

4.在 7 号管中加入 5 μL 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照，充分震荡 1 分钟，得1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。5.换枪头，在 6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。

6.换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1×10E6 拷贝/μL 的阳性对照到 5 号管中，充分震荡 1 分钟，得 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。

7.换枪头，在 4 号管中加 5 μL 1×10E5 拷贝/μL 的阳性对照到 4 号管中，得1×10E4 拷贝/μL 的阳性对照。放冰上待用。8.重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。放冰上待用。

设置 qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

9.在 PCR 管中加入下列成分（待测样品需要做三次重复，下表只列出一次。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后最后加）：

注:仅 ABI7500、7700 和 7900 仪器需要使用 ROX 作为对照，其他荧光 PCR 仪器（如 iCycler IQ、MJ Option、MJ Chromo4、MX3000、MX4000、RotorGene3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480）不需要使用 ROX，则用水替代。

10. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR（具体 PCR 参数可以根据仪器不同而自行

优化）。

过程温度时间

预变性95℃1 分钟

PCR 反应95℃15 秒

（30 个循环）60℃15 秒

72℃15 秒

11. 数据采集

具体操作按所用仪器推荐的流程进行。本产品中所含的荧光染料在不结合 DNA 时，

最大吸收光谱在 471 nm，结合 DNA 时的最大吸收光谱在 500 nm，最大发射光

谱在 530 nm。

四、数据处理

12. 以阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品

的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。

组成及试剂配制:

1、酶标板：一块（96孔）

2、 标准品（冻干品）： 2瓶，请临用前15分钟内配制。每瓶以样品稀释液稀释至0.5ml，盖好后室温静置大约10分钟，同时反复颠倒/搓动以助溶解，其浓度为200 U/L，然后做系列倍比稀释（注：不要直接在板中进行倍比稀释），分别配制成200 U/L，100 U/L，50 U/L，25 U/L，12.5 U/L，6.25 U/L，3.12 U/L，样品稀释液直接作为空白孔 0 U/L。如配制100 U/L标准品：取0.3ml （不要少于0.3ml ）200 U/L的上述标准品加入含有0.3ml样品稀释液的Eppendorf管中，混匀即可，其余浓度以此类推。

3、 样品稀释液：1×20ml。

4、 检测稀释液A：1×10ml。

5、 检测稀释液B：1×10ml。

注意事项：

1．基础程序；

2．扩增温度和延伸温度；

3．反应时间；

4．循环次数；

5．PCR 反应液的配制；

6．PCR技术的基本原理；

7．PCR的反应动力学；

8．PCR扩增产物；

9．PCR反应体系与反应条件。

【储存条件及有效期】:

-20℃避光保存，避免反复冻融，有效期6个月。

【适用仪器】:

ABI7300、ABI7500、LightCycler 480、iCycleriQ5、CFX96、SLAN等荧光定量PCR仪。

【样本采集、存放及运输】

u 样本采集：各类型样本按照常规方法采集；

u 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（最多冻融3次）；

u 运输：采用泡沫箱加冰密封进行运输。

【自备试剂】:产品仅用于科研实验