**鸟类多瘤病毒PCR定量试剂盒说明书**

产品名称：鸟类多瘤病毒PCR定量试剂盒

产品规格：50次

运输：低温

保存：负20度

有效期：一年

货期：现货

鸟类多瘤病毒PCR定量试剂盒产品及特点:

因此快速灵敏检测禽白血病病毒I亚群RT-具有重要意义。本产品就是为此目的根据 PCR 原理开发的试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供 DNA 模板。

2. 引物经过精心优化，专一性强，只扩增禽白血病病毒I亚群RT-，与其他植物没有交叉反应。

3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。

4. PCR mix 中含上样染料，PCR 后可以直接上样电泳。

5. 本试剂盒足够做 40μL 体系的 PCR 50 次，但只能用于科研。

PCR实验方法步骤：

方法

1：在冰浴中，按以下次序将各成分加入一无菌0.5ml离心管中。

10×PCR buffer

5 μl dNTP mix（2mM）

4 μl 引物1（10pM）

2 μl 引物2（10pM）

2 μl Taq酶（2U/μl）

1 μl DNA模板（50ng-1μg/μl）

1 μl 加ddH2O至50 μl

视PCR仪有无热盖，不加或添加石蜡油。

2：调整好反应程序。将上述混合液稍加离心，立即置PCR仪上，执行扩增。一般：在93℃预变性3-5min，进入循环扩增阶段：93℃40s → 58℃30s → 72℃60s，循环30-35次，在72℃保7min。

3：结束反应，PCR产物放置于4℃待电泳检测或-20℃长期保存。

4：PCR的电泳检测：如在反应管中加有石蜡油，需用100μl氯仿进行抽提反应混合液，以除去石蜡油；否则，直接取5-10μl电泳检测。

产品仅用于科研14℃或－20℃样品收集、处理及保存方法

1. 血清：使用不含热原和内毒素的试管，操作过程中避免任何细胞刺激，收集血液后，3000 转离心10 分钟将血清和红细胞迅速小心地分离。

2. 血浆：EDTA、柠檬酸盐或肝素抗凝。3000 转离心30 分钟取上清。

3. 细胞上清液：厂家3000 转离心10 分钟去除颗粒和聚合物。

4. 组织匀浆：将组织加入适量生理盐水捣碎。3000 转离心10 分钟取上清。

5. 保存：如果样本收集后不及时检测，请按一次用量分装，冻存于-20℃，避免反复冻融，在室温下解冻并确保样品均匀地充分解冻。

需要自备的器材：

1．产品仅用于科研仪器：分析天平、离心机、荧光 PCR 扩增仪、组织研磨器、-20 ℃冰箱、可调移液器（2 µL、20

µL、200 µL、1000 µL）。

2．耗材：荧光 PCR 专用反应管、眼科剪、眼科镊、生理盐水、1.5 mL 经焦碳酸二乙酯（DEPC）水

处理的灭菌离心管、吸头（10 µL、200 µL、1000 µL）、灭菌双蒸水。

特点：

1.厂家即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板，操作简单，定量准确快速。

2. 引物经过优化，特异性强。预期的 PCR 产物长度为 560 bp。

3. PCR mix 中含上样染料，PCR 后可以直接上样电泳。

4. 提供阳性对照，便于分析试验结果。操作流程：

1.整个检测过程应严格按照本说明书要求分别在试剂准备区、样本处理区和PCR扩增区进行操作，各区实验服、仪器、耗材应独立使用，不能混用；实验用吸头采用带滤芯吸头；样本处理区应配有生物安全柜，样本处理在生物安全柜中进行操作；三个区应该配有紫外线杀菌装置。

2.为避免RNA降解，样本处理过程应在0-4℃条件下操作，且完成实验后立即上机检测；样本处理过程中使用的器具耗材应经过无核酶处理。

3.每次实验应该设置阴、阳性对照。

4.试剂盒所有试剂在使用前应该在常温下充分融化混匀，并应瞬时离心。

5.试剂盒内所配阴性和阳性对照在一次使用前应全部转移至标本准备区，并单独存放。

6.为防止荧光干扰，应避免裸手直接接触PCR反应管，并应避免在PCR反应管上进行任何标记。

7.仪器扩增相关参数应按照本说明书相关要求进行设置；不同批号试剂不能混用。

8. ABI系列荧光定量PCR仪参数设置中不选ROX校正，淬灭基因选择None。

9.实验过程中产品的废弃物应该进行无害化处理后方可丢弃。

储存条件：

14℃或－20℃样品收集、处理及保存方法

1.血清：使用不含热原和内毒素的试管，操作过程中避免任何细胞刺激，收集血液后，3000转离心10分钟将血清和红细胞迅速小心地分离。

2.血浆：EDTA、柠檬酸盐或肝素抗凝。3000转离心30分钟取上清。

3.细胞上清液：3000转离心10分钟去除颗粒和聚合物。

4.组织匀浆：将组织加入适量生理盐水捣碎。3000转离心10分钟取上清。

5.保存：如果样本收集后不及时检测，请按一次用量分装，冻存于-20℃，避免反复冻融，在室温下解冻并确保样品均匀地充分解冻。

反应五要素：

参加PCR反应的物质主要有五种即引物、酶、dNTP、模板和Mg2+

引物：引物是PCR特异性反应的关键，PCR 产物的特异性取决于引物与模板DNA互补的程度。理论上，只要知道任何一段模板DNA序列， 就能按其设计互补的寡核苷酸链做引物，利用PCR就可将模板DNA在体外大量扩增。设计引物应遵循以下原则：

①引物长度： 15-30bp，常用为20bp左右。

②引物扩增跨度： 以200-500bp为宜，特定条件下可扩增长至10kb的片段。

③引物碱基：G+C含量以40-60%为宜，G+C太少扩增效果不佳，G+C过多易出现非特异条带。ATGC\*随机分布，避免5个以上的嘌呤或嘧啶核苷酸的成串排列。

④避免引物内部出现二级结构，避免两条引物间互补，特别是3'端的互补，否则会形成引物二聚体，产生非特异的扩增条带。

⑤引物3'端的碱基，特别是最末及倒数第二个碱基，应严格要求配对，以避免因末端碱基不配对而导致PCR失败。

⑥引物中有或能加上合适的酶切位点， 被扩增的靶序列\*有适宜的酶切位点， 这对酶切分析或分子克隆很有好处。

⑦引物的特异性：引物应与核酸序列数据库的其它序列无明显同源性。

引物量：每条引物的浓度0.1～1umol或10～100pmol，以\*引物量产生所需要的结果为好，引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增，且可增加引物之间形成二聚体的机会。

运输及保存：低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。阳性对照需要单独放置，不要污染其他试剂。

自备试剂：样品 DNA。