**胸膜肺炎放线杆菌PCR检测试剂盒说明书**

产品名称:胸膜肺炎放线杆菌PCR检测试剂盒

英文名称:Actinobacillus pleuropneumoniaePCR

**技术特点**：

1胸膜肺炎放线杆菌PCR检测试剂盒在哪里有卖准确可靠，临床双盲对照试验＞1000例，结果与金标准测序法比对，结果\*性大于99%。

2高灵敏：可检测低至10ng的人基因组DNA。

3快速：整个检测流程只需3小时。

4产品仅用于科研简便：试剂盒提供预混好的试剂，使体系配置操作简便。

5防污染

6高特异性：双重特异性组成，保证检测结果的特异性和准确性引物与DNA互补链结合必需完全配对，才能延伸。探针特异性与所检测基因的PCR产物配对，在延伸中产生荧光。

**产品及特点**：

1. 即开即用，用户只需要提供放线杆菌样品。

2. 根据伴放线放线杆菌保守序列设计的专一性引物，与相关病毒无交叉反应。

3. 灵敏度可以达到几百拷贝/反应。

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。

**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。

实验注意事项：

1）RT-PCR可以检测组织、细胞、血液、细菌等很多材料，不同的样本有不同要求，实验前请充分沟通确认实验方案和样本情况；

2）客户尽可能提供实验的背景信息、物种、基因准确的名称和ID号；

3）客户尽量不要提供DNA或RNA样品。

4）样本保存于液氮或干冰，也可以保存于Trizol液中。

实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qPCR）是指在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程，\*通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。实时荧光定量PCR的化学原理包括探针类和非探针类两类，探针类是利用与靶细胞序列特异性杂交的探针来指示扩增产物的增加，非探针类是利用荧光染料或者特异性设计的引物来指示扩增的增加。运用该技术可以对DNA、RNA样品进行定量（包括\*定量和相对定量）和定性分析。

主要服务：DNA或RNA的\*定量分析、基因表达差异分析、基因分型。

主要技术：引物设计、RNA提取、cDNA合成、qPCR。

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。