**包纳米虫（Bona）核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书**

产品仅用于科研产品名称:包纳米虫（Bona）核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

规格:48T 0.1PCR管/48T 0.2PCR管

技术服务内容：

实验步骤包括RNA提取、反转录、PCR和琼脂糖凝胶电泳，以软件分析电泳条带的灰度值（IOD值），通过与内参基因的灰度值比较，判断目的mRNA的相对表达量。

使用方法:

一、样品 RNA 的制备

1、用自选方法抽提病毒样品 RNA。注意：可以选用本公司生产的一管式病毒 RNAout

2、或柱式病毒 RNAout。

二：RT（逆转录）反应合成 cDNA

1. 按下表配制 RT 反应体系（20 μL 体系）

2. 70℃保温 5 分钟变性模板后立即冰浴。

3. 严格按顺序加入 6μL RT Buffer（含 dNTP）和 2μL MMLV 逆转录酶（含 RI），

反应终体积为 20μL。

4. 42℃保温 60 分钟。此步为 RT 反应。

5. 70℃保温 10 分钟以终止反应，然后放置在冰上待用。合成的 cDNA 可以直接作为 PCR 模板使用，丌需要纯化。

三、操作方法

1样本的处理（在样本制备区进行）：
1.1、取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，其中 n 为被检样品与阴性对照的和（阳性对照、阴性对照在试剂盒中已标出），做标记。(注：试剂盒中的阳性对照直接作为 PCR 检测的模板，无需提取核酸)
1.2、每管加入 600 L 裂解液，分别加入被检样本和阴性对照各 200 L，一份样本换用一个吸头，再加入 200 L 氯仿，混匀器上振荡混匀 5 s（不能过于强烈，以免产生乳化层，也可以用手颠倒混匀），于 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min。
1.3、取与1.1 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，加入 500 L 异丙醇（-20℃预冷）， 做标记。吸取1.2 各管中的上清液转移至相应的管中，上清液应至少吸取 500L，不能吸出中间层，颠倒混匀。
1.4、于 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清，倒置于吸水纸上，沾干液体(不同样品须在吸水纸不同地方沾干)；加入 600 L 75％ 乙醇，颠倒洗涤。1.5、于 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清，倒置于吸水纸上，尽量沾干液体（不同样品须在吸水纸不同地方沾干）。
1.6、4 000 r/min 离心 10s（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），将管壁上的残余液体甩到管底部，小心倒去上清，用微量加样器将其吸干，一份样本换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面，室温干燥 3 min，不能过于干燥，以免 RNA 不溶。
1.7、加入 11 L DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2 000 r/min 离心 5 s，冰上保存备用。提取的 RNA 须在 2 h 内进行 PCR 扩增；若需长期保存须放置-70 ℃冰箱内。
【也可参照《病毒 RNA 柱式提取试剂盒说明书》（货号：HB-QPCR-01）使用，更方便快捷提取核酸】。
注：提取的 RNA 须在 2 h 内进行 PCR 扩增；若需长期保存须放置-70 ℃冰箱内

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。