**大森林埃博拉病毒PCR检测试剂盒说明书**

使用方法：

测定法的灵敏度来自作为报告的酶。酶是一种有机催化剂，很少量的酶即可诱导大量的催化反应，产生可供观察的显色反应现象。因此该体系常被称为酶放大体系。

1. 标准品的稀释：本试剂盒提供原倍标准品一支，用户可按照下列图表在小试管中进行稀释。 24μg/ml 5号标准品 150μl的原倍标准品加入150μl标准品稀释液

 12μg/ml 4号标准品 150μl的5号标准品加入150μl标准品稀释液

 6μg/ml 3号标准品 150μl的4号标准品加入150μl标准品稀释液

 3μg/ml 2号标准品 150μl的3号标准品加入150μl标准品稀释液

 1.5μg/ml 1号标准品 150μl的2号标准品加入150μl标准品稀释液

2. 加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样50μl，待测样品孔中先加样品稀释液40μl，然后再加待测样品10μl（样品终稀释度为5倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。|

3. 温育：用封板膜封板后置37℃温育30分钟。

4. 配液：将30倍浓缩洗涤液用蒸馏水30倍稀释后备用

5. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置30秒后弃去，如此重复5次，拍干。

6. 加酶：每孔加入酶标试剂50μl，空白孔除外。

7. 温育：操作同3。

8. 洗涤：操作同5。

9. 显色：每孔先加入显色剂A50μl，再加入显色剂B50μl，轻轻震荡混匀，37℃避光显色15分钟.

10. 终止：每孔加终止液50μl，终止反应（此时蓝色立转黄色）。

11. 测定：以空白空调零，450nm波长依序测量各孔的吸光度（OD值）。 测定应在加终止液后15分钟以内进行。

实验规则：

1、要保证移液枪的准确性，误差不能超过2%。可用水和电子天平进行确定。但有专业人员进行矫正。

2、要配备20ul、50ul、100ul、1000ul和排枪各一支。吸取不同的液体后，要更换枪头。即使是吸取标准品时。

3、要在实验前1小时将试剂盒从冰箱中取出，使各种试剂都恢复到室温，以使结果更稳定。

4、实验时，要使底物避光保存。

5、用枪吸取液体时速度不能太快，以免产生气泡而使吸取量不准确。

6、吸取液体时，要用量程和需要量接近的枪去吸，减少误差。

7、将液体加到酶标孔中时，避免枪头和孔内液体接触，可使枪头上的液滴和孔壁接触，液滴会自然流下去。

8、液体全部加完后，可将酶标板在桌子上平行轻轻晃动30秒，混匀液体。也可以用酶标仪的晃动功能。

9、应尽量做双孔实验，这样才能保证数据的准确性。

10、对结果有疑问的样品要用其它方法进行确证。

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。