快速病毒RNA免核酸提取

SYBR Green荧光PCR检测试剂盒

**试剂盒简介：**本试剂盒中采用独特配方，能够快速高效的裂解各种常见样本，无需重复离心便可获得高质量的病毒RNA，适用于以RNA为模板的定量PCR的检测。本产品可用于细胞培养液、血液、血清中病毒RNA的提取。

# 试剂盒组成

|  |  |
| --- | --- |
| **组分** | **M-DNA01** |
| RNA-Lysis |  1.5 mL （50T） |
| 2×one step SYBR Green Mix  | 200 μL ( 50T ) |
| SYBR Green Enzyme | 50 μL ( 50T ) |
| 样品稀释液 | 20 ml ( 50T ) |

**保存期****：**-20ºC 保存，保存期一年。

**注意：使用前将RNA-Lysis室温充分混匀。**

# 准备的仪器：离心机、移液器、PCR仪

# 使用方法

1. **样品的处理方法**

1.少量样本处理方法

（1）吸取15μL样本放入1.5ml离心管中。

（2）加入25 μL RNA Lysis。

（3）充分混匀,室温静置5分钟，加入350µL样品稀释液混匀。

（4）10,000rpm离心1分钟，取1-2μL作为PCR反应模板。

2.大量样本处理方法

（1）分别吸取15μL不同的样本依次放入8联管中。

（2）加入25 μL RNA Lysis。

（3）充分混匀,室温静置5分钟，10,000rpm离心1分钟。

（4）分别从（3）中吸取10μL处理后样品依次加入一新的8联管。

（5）每孔分别加入90µL样品稀释液混匀。取1-2μL作为荧光PCR反应模板。

**二、在RNase free 的离心管中配制PCR反应体系(以ROCH 480 为测试机型)**

|  |  |
| --- | --- |
| **PCR反应体系** | **20 μL体系（推荐）** |
| 2×one step SYBR Green Mix  | 10 μL |
| SYBR Green Enzyme | 1μL |
| Forward Primer (10 μM) | 0.4-1μL |
| Reverse Primer (10 μM) | 0.4-1 μL |
| Template RNA | 1-2 μL |
| ddH2O | 补足至20 μL |

**三、反应程序**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **温度** | **时间** | **循环数** |
| 逆转录 | 50ºC | 15min | 1 |
| 预变性 | 95ºC | 30sec | 1 |
| 循环反应 | 95ºC | 10sec | 40-45 |
| 60ºC | 30sec |
| 溶解曲线 | 95ºC | 5sec | 1 |
| 55ºC | 1min | 1 |
| 97ºC | - | 1 |

 对于有复杂结构的模板，可以将逆转录温度提高到55ºC，有助于提高扩增效率；

延伸时间请根据使用仪器所需要的数据采集最短时间进行调整；

溶解曲线的设定，根据仪器的默认采集程序设定即可。

# 注意事项

（1）在进行大量样品检测时，可将本试剂盒的试剂预分装到8联 PCR管，用多通道移液器进行多样本的处理。

（2）取样的细胞量应当适中，浓度不宜过高或过低，处理后溶液应当以透明为宜。扩增病毒基因时需要根据病毒的滴度决定取样的细胞数量。

（3）样品处理过程中应当防止交叉污染，推荐设置阴性样品参与处理过程，以检测环境的污染。

（4）PCR的退火温度可根据引物的预测Tm值减去5℃，或者通过梯度PCR摸索最佳退火温度。

（5）用本试剂盒处理的样品可于-20℃保存 1个月。

（6）为防止试剂盒污染，请勿将不同批号试剂盒混用。