

钩端螺旋体 PCR 检测试剂盒使用说明书

用途 钩端螺旋体 (*Leptospira*) 聚合酶链反应 (PCR) 试验用于检测各种动物尿液、阴道分泌物、流产物、乳汁、血液等样品中的钩端螺旋体, 适用于钩端螺旋体的检测、诊断和流行病学调查。

原理 利用离心柱内惰性大分子膜提取病料 DNA 作为模板, 高温使模板的一条双链 DNA 变性后形成两条单链, 低温使引物与互补的模板形成双链, 中温时, 在 TaqDNA 聚合酶作用下, 以 dNTP 为原料, 以引物为复制的起点, 沿模板合成一条新链。每个循环包括: 高温变性、低温退火、适温延伸三个过程。每一次循环使扩增的 DNA 片段拷贝数放大一倍。经过 35 次循环, 使扩增的 DNA 片段放大了数百万倍。将扩增产物进行电泳, 经染色后, 在紫外灯照射下, 肉眼可见到 DNA 片段的扩增带。

试剂盒组成

名称	10 头份	50 头份	贮藏条件
0.2 mL 薄壁 PCR 管	15 个	60 个	室温 (A 盒)
DNA 吸附柱和收集管	10 套	50 套	
消化液	2.4 mL	11mL	
DNA 结合液	3.6 mL	16mL	
DNA 洗涤液	12 mL	52mL	
DNA 洗脱液	1 mL	4 mL	
矿物油	300 μ L	1.2 mL	
50 倍 TAE 电泳缓冲液 (50 倍稀释后使用)	20 mL	100 mL	
染色液	20 μ L	50 μ L	
蛋白酶 K	240 μ L	1.1mL	-20 $^{\circ}$ C (B 盒)
阴性对照	350 μ L	1 mL	
阳性对照	350 μ L	1 mL	
PCR 反应液	200 μ L	1 mL	
Taq DNA 聚合酶	25 μ L	120 μ L	

保存期 本产品有效期为 6 个月。

需自备的物品

1. 仪器: 分析天平、水浴锅、离心机、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪 (或紫外分析仪)、微波炉、组织研磨器、-20 $^{\circ}$ C 冰箱、可调移液器 (2 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L)。
2. 耗材: 眼科剪、眼科镊、称量纸、20 mL 一次性注射器、1.5 mL 灭菌离心管、琼脂糖、500 mL 量筒、500 mL 锥形瓶、吸头 (10 μ L、200 μ L、1000 μ L)、灭菌双蒸水。

注意事项

1. 所有接触病料的物品均应合理处置, 以免污染实验室。
2. PCR 整个试验分配液区、模板提取区、扩增区、电泳区。流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区→电泳区。严禁器材和试剂倒流。
3. 所有试剂应在规定的温度储存。-20 $^{\circ}$ C 保存的各试剂管使用前应完全融化, 8000 rpm 离心 15 s, 使液体全部沉于管底, 放于冰盒中, 吸取液体时移液器吸头尽量在液体表面层吸取, 使用后应立即放回 -20 $^{\circ}$ C。
4. 消化液低温时可能出现结晶, 请于 37 $^{\circ}$ C 温育, 溶解至澄清透明后使用。

5. 染色液低毒，操作时应戴上手套，避光保存，较长时间不使用请存放于 4℃，以免挥发变干。

染色液和上样缓冲液使用前也请离心使液体沉于管底。

6. 注意防止试剂盒组分受污染。不要使用超过有效期限的试剂，试剂盒之间的成分不要混用。

7. 严格遵守操作说明可以获得最好的结果。操作过程中移液、定时等全部过程必须精确。

8. 反复冻融试剂将减低检测灵敏度，建议在 3 次内用完，请严格按试剂盒说明书操作。

样品制备

1 样品采集：初期采血液（加抗凝剂），中、后期采尿液、脊髓液或血清，以及流产胎盘和羊水等阴道分泌物，死后取肾、脾等有局部病变的器官。

2 样品处理：每份样品分别处理。

2.1 组织样品处理：每份组织分别从三个不同的位置称取样品约 1g，用手术剪剪碎混匀后取 0.05 g 于研磨器中研磨，加入 1.5 mL 生理盐水继续研磨，待匀浆后转至 1.5 mL 灭菌离心管中，8000 rpm 离心 2 min，取上清液 100 μL 于 1.5 mL 灭菌离心管中，再加入 200 μL 消化液和 20 μL 蛋白酶 K，振荡混匀后，置 56℃ 水浴中消化 1 小时。

2.2 全血样品处理：待血凝后取血清 100 μL，加入 200 μL 消化液和 20 μL 蛋白酶 K，振荡混匀后，置 56℃ 水浴中消化 1 小时。

2.3 抗凝血样品处理：取抗凝血 100 μL，加入 200 μL 消化液和 20 μL 蛋白酶 K，振荡混匀后，置 56℃ 水浴中消化 1 小时。

2.4 阳性对照处理：取阳性对照 100 μL，加入 200 μL 消化液和 20 μL 蛋白酶 K，振荡混匀后，置 56℃ 水浴中消化 1 小时。

2.5 阴性对照处理：取阴性对照 100 μL，加入 200 μL 消化液和 20 μL 蛋白酶 K，振荡混匀后，置 56℃ 水浴中消化 1 小时。

操作步骤

1 病毒 DNA 的提取

1.1 从水浴锅中取出样品管，降至室温后，加入 300 μL DNA 结合液，颠倒混匀，将全部液体移入吸附柱中（吸附柱要套上收集管，吸取液体时尽量不要吸到悬浮杂质，抗凝血需 10000 rpm 离心 1min，以免离心时堵塞吸附柱），室温静置 3 min，10000 rpm 离心 30 s。

1.2 弃去收集管中液体，加入 500 μL DNA 洗涤液，10000 rpm 离心 30 s。

1.3 重复步骤 1.2。

1.4 弃去收集管中液体，10000 rpm 空柱离心 1 min，以除去残留的 DNA 洗涤液。

1.5 将吸附柱放入新的 1.5 mL 离心管中，向柱中央加入 DNA 洗脱液（最好 56℃ 预热）50 μL，室温放置 2 min，10000 rpm 离心 30 s，离心管中液体即为模板 DNA。

2 PCR 扩增

每份总体积 20 μL，含 16 μL PCR 反应液（用前混匀），2 μL Taq DNA 聚合酶，2 μL 模板 DNA。

例如：n 份样品，配制 n+1 份，16×（n+1）PCR 反应液，再加入 2×（n+1）Taq DNA 聚合酶，混匀后取 18 μL 分装成 n 份，分别加入 2 μL 模板 DNA，加入 20 μL 矿物油覆盖（有热盖的 PCR 扩增仪不用加），作好标记。

在 PCR 扩增仪上进行以下程序：94℃ 3 min；循环 94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 30 s，共 35 次；再 72℃ 延伸 7 min。

3 电泳

称 4 g 琼脂糖放于 500 mL 锥形瓶中，加入 50 倍稀释的 TAE 电泳缓冲液 200 mL（取 4 mL 50 倍 TAE 电泳缓冲液，用双蒸水稀释至 200 mL），于微波炉中熔解，再加入 10 μL 染色液混匀。在电泳槽内放好梳子，倒入琼脂糖凝胶，待凝固后将 PCR 扩增产物 10 μL 混合 2 μL 上样缓冲液，点样于琼脂糖凝胶孔中，以 110~120 V 电压于 50 倍稀释的 TAE 电泳缓冲液中电泳，紫外灯下观察结果。

结果判定 阳性对照出现 242 bp 扩增带、阴性对照无带出现（引物带除外）时，试验结果成立。

被检样品出现 242 bp 扩增带为钩端螺旋体阳性，否则为阴性。