衣原体 PCR 检测试剂盒使用说明书

用途 衣原体聚合酶链反应（PCR）试验用于检测各种动物结膜、鼻咽拭子、粪便和脾脏、肺脏、肠粘膜、流产物等组织样品中的衣原体，适用于衣原体的检测、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	50 头份	贮藏条件
0.2 mL 薄壁 PCR 管	60 个	室温（A 盒）
DNA 吸附柱	50 个	
收集管	100 个	
蛋白酶 K	1.1mL	
溶液 AL	10mL	
无水乙醇	12mL	
DNA 结合液	30mL	
DNA 洗涤液	30mL	
DNA 洗脱液	12 mL	
矿物油	1.2 mL	
50 倍 TAE 电泳缓冲液（50 倍稀释后使用）	100 mL	
染色液	50 μL	
阴性对照	**1 mL**	**-20 ℃（B 盒）**
阳性对照	**1 mL**	
PCR 反应液	**1 mL**	
Taq DNA 聚合酶	**120 μL**	

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 ℃冰箱、可调移液器（2 μL、20 μL、200 μL、1000 μL）。

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 μL、200 μL、1000 μL）、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℃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，使用后立即放回-20 ℃。

4．**溶液低温时可能出现结晶，请于 37 ℃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. 反复冻融试剂将降低检测灵敏度，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：待检病死或扑杀动物，取肺脏、脾脏、肠粘膜、流产物等组织；待检动物，眼部及结膜分泌物、鼻咽拭子及排泄物放于 50%甘油生理盐水中。2～8 ℃保存，送实验室检测。（要求送检病料新鲜，严禁反复冻融。）。（要求送检病料新鲜，严禁反复冻融病料。）

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 ℃浴中消化 1 小时。

2.2 排泄物或分泌物样品处理：将排泄物或分泌物振荡混匀或取粪便约 0.05 g 到离心管中加入 1.5 mL 生理盐水振荡混匀，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。

2.3 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 ℃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 200 μL 无水乙醇，涡旋振荡 15s，10000rpm 离心 15s。

1.2 将 1.1 中的样品转移到吸附柱中，套上收集管，10000rpm 离心 1min，弃去收集管及管中的液体。

1.3 将吸附柱套入一个新的收集管中，加入 500 μLDNA 结合液，10000rpm 离心 1min，弃去收集管及管中的液体。

1.4 将吸附柱套入一个新的收集管中，加入 500 μLDNA 洗涤液，13000rpm 离心 3min，弃去收集管及管中的液体。

1.5 将吸附柱放入一个新的 1.5 mL 离心管中，加入 100 μL DNA 洗脱液（移液器枪头请勿接触到膜），室温放置 1min，10000 rpm 离心 1min，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，55 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，共 35 次；再 72 ℃延伸 10 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，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 294 bp 扩增带、阴性对照无带出现（引物带除外）时，实验结果成立。被检样品出现 294 bp 扩增带为衣原体阳性，否则为阴性。