

吉氏巴贝斯虫实时荧光 PCR 检测试剂盒使用说明书

用途 本试剂盒采用实时荧光 PCR 方法检测犬 EDTA 抗凝血和脾脏、肺脏等组织中的吉氏巴贝斯虫，适用于吉氏巴贝斯虫的检测、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，以引物为起点合成与 DNA 模板，在热启动 Taq 酶的作用下，经高温变性、中温退火及延伸的循环，使特异 DNA 片段的拷贝数放大一倍，经荧光素标记的探针与扩增的 DNA 杂交，利用 Taq 聚合酶的 5'→3'外切活性，使荧光探针的报告基团与淬灭基团分离，发出特异性荧光信号，利用荧光 PCR 仪检测特异性荧光信号，根据样品 Ct 值的大小及扩增曲线的形成情况判定结果。

试剂盒组成

名称	50 头份	贮藏条件
DNA 吸附柱和收集管	50 套	室温 (A 盒)
消化液	11mL	
DNA 结合液	16mL	
DNA 洗涤液	52mL	
DNA 洗脱液	4 mL	
蛋白酶 K	1.1mL	-20 °C (B 盒)
阴性对照	1 mL	
阳性对照	600 µL	
无菌无核酸酶水	600 µL	
PCR 反应液	600 µL	
荧光探针	125 µL	

保存期 本产品有效期为 12 个月。

需要自备的物品

1. 仪器：分析天平、水浴锅、离心机、荧光 PCR 扩增仪、组织研磨器、-20 °C 冰箱、可调移液器 (2 µL、20 µL、200 µL、1000 µL)。
2. 耗材：荧光 PCR 专用反应管、眼科剪、眼科镊、生理盐水、1.5 mL 灭菌离心管、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。流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区。严禁器材和试剂倒流。
3. 所有试剂应在规定的温度储存。-20 °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 °C。
4. 消化液低温时可能出现结晶，请于 37 °C 温育，溶解至澄清透明后使用。
5. 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。
6. 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。
7. 反应体系应在特定配液区或者超净工作台中配制，整个实验过程严格控制污染。
8. 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。
9. 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：病死犬，取脾脏、肺脏等组织病变部与健康部交界处组织；待检病犬，取 EDTA 抗凝血 2mL。2~8℃保存，送实验室检测。（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 ℃ 水浴中消化 1 小时。

2.2 EDTA 抗凝血样品处理：混匀取液体 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 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。

2.4 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，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 实时荧光 PCR 操作

设被检样品、阴性对照和阳性对照总和为 N，则反应体系配制如下：

试剂	体系
无菌无核酸酶水	$5.9 \times (N+1) \mu\text{L}$
PCR 反应液	$10 \times (N+1) \mu\text{L}$
荧光探针	$2.1 \times (N+1) \mu\text{L}$

将以上配制的反应体系充分混匀后，分装每个反应管中各 18 μL。

分别取 2 μL 模板 DNA，加入相应反应管中，混匀并作好标记。在荧光 PCR 扩增仪上进行以下反应：95 ℃ 2 min；循环 95 ℃ 5 s，60 ℃ 35 s，共 40 次，每次循环的第二步（60 ℃ 35 s）收集荧光信号（报告基团“FAM”，淬灭基团“None”）。

结果判定

1 结果分析条件设定

阈值设定原则：阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

2 结果描述及判定

阳性对照 Ct 值 ≤ 30 并出现特定的扩增曲线，阴性对照无 Ct 值并且无特定扩增曲线，实验结果成立；被检样品 Ct 值 ≤ 30 并出现特定的扩增曲线为吉氏巴贝斯虫阳性；被检样品 30 < Ct < 37 并出现特定的扩增曲线，需重新取样提取 DNA，扩增后进行结果判定，如仍是可疑，则判定为阳性；被检样品 Ct 值 ≥ 37 时，超过本方法检测灵敏度范围，判定为阴性；对于某些未呈现 S 型曲线，但本底较高的样品，应为阴性。