

弓形虫 PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 的聚合酶链反应 (PCR) 试验用于检测粪便、血液、渗出液、组织、流产胎儿中的弓形虫, 适用于弓形虫的检测、诊断和流行病学调查。

【原理】

提取样品 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。经过多次循环, 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
阴性对照	350 μ L	1 mL	-20 $^{\circ}$ C
阳性对照	350 μ L	1 mL	
PCR 反应液	200 μ L	1 mL	
X 液	5 μ L	10 μ L	
Taq DNA 聚合酶	25 μ L	120 μ L	
0.2 mL 薄壁 PCR 管	15 个	60 个	
说明书	1 份	1 份	

【需要自备的器材】

1. 试剂: 核酸提取试剂、琼脂糖、电泳试剂等。
2. 仪器: 分析天平、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、-20 $^{\circ}$ C 冰箱、可调移液器 (2 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L)。
3. 耗材: 称量纸、20 mL 一次性注射器、500 mL 量筒、500 mL 锥形瓶、经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水处理的灭菌 1.5mL 离心管和吸头 (10 μ L、200 μ L、1000 μ L)、灭菌双蒸水。

【使用注意事项】

1. 建议与世纪元亨提供的柱式 DNA 核酸提取试剂盒 (含电泳试剂) 配套使用。
2. 实验过程中进行阴性对照和阳性对照样品的质量控制, 需进行提取, 建议提取用量分别为 100 μ L。
3. 所有接触病料的物品均应合理处置, 以免污染实验室。
4. 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。
5. 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, 8000rpm 离心

15s, 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 $^{\circ}$ C。

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。
9. 反复冻融试剂将减低检测灵敏度, 本试剂盒应在 3 次内用完。

【样品采集】

待检动物, 用棉拭子取排泄物, 置于 50% 甘油生理盐水中或者将粪便取到无菌的小青瓶中; 待检动物, 用注射器抽取 EDTA 抗凝血或腹水、淋巴结穿刺液等。2~8 $^{\circ}$ C 保存, 送实验室检测。(要求送检病料新鲜, 严禁反复冻融病料。)

【PCR 操作】

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

例如: n 份样品, 配制 n+1 份, 16 $\times$ (n+1) PCR 反应液, 再加入 2 $\times$ (n+1) Taq DNA 聚合酶, 混匀后取 18 μ L 分装成 n 份, 分别加入 2 μ L 模板 DNA (阳性对照管加入 1 μ L 阳性对照 DNA 和 1 μ L X 液), PCR 扩增仪若无热盖则要在管中加矿物油覆盖, 作好标记。

在 PCR 扩增仪上进行以下程序: 94 $^{\circ}$ C 3min; 循环 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 共 35 次; 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

【电泳】

称 3 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), 于微波炉中溶解, 再加入 10 μ L 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 μ L 混合 2 μ L 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 319 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 319 bp 扩增带为弓形虫阳性, 否则为阴性。

【规格】10 头份/盒 50 头份/盒

【保存及有效期】0.2 mL 薄壁 PCR 管可存放于室温, 其他试剂于 -20 $^{\circ}$ C 以下保存, 有效期为 6 个月。

【生产企业】哈尔滨元亨生物药业有限公司

【地址】哈尔滨利民开发区珠海路 1 号