

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】

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	
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】

初期采血液(加 EDTA 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,死后取肾、脾等有局部病变的器官。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,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 3 min;循环 94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 35 次;再 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

【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,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。

【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