

## 伯氏疏螺旋体（伯氏包柔螺旋体）PCR试剂盒说明书

试剂盒简介 为了适应伯氏疏螺旋体（伯氏包柔螺旋体）PCR试剂盒快速检测和疫病研究的需要，本公司参照 OIE 国际标准中规定的引物序列，经多次实验及系统优化，开发生产了本试剂盒。应用本试剂盒进行检测具有快速、灵敏、特异、准确、安全操作简单、应用广泛和高通量检测等特点及优点。

### 操作流程：

1. 从室温平衡20min后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回4℃。
2. 设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品50 μL；
3. 样本孔中加入待测样本50 μL；空白孔不加。
4. 除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体100 μL，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育60min。
5. 弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液（350 μL），静置1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板5次（也可用洗板机洗板）。
6. 每孔加入底物A、B各50 μL，37℃避光孵育15min。
7. 每孔加入终止液50 μL，15min内，在450nm波长处测定各孔的OD值。

**样本：**血清 血浆 组织匀浆等液体样本

**标记物：**血清 血浆 组织匀浆等

**应用：**仅用科研实验检测定量，定性检

**检测方法：**夹心法

**技术要求：**全程按说明书步骤检测，操作规范，专业，仪器设备齐全。

**规格：**48t/96t

**性状：**液体

**运输方式：**快递发货

**有效期：**6个月

**特点：**灵敏性高，---性，吸附均匀，吸附性好，回收利用率高，是一款可以让您放心选购的产品。

**使用范围：**此产品供科研实验使用，不得用于---。

**用途：**用于测定人血清、血浆、组织及相关液体样本中的含量或活性。

### 反应五要素：

参加PCR反应的物质主要有五种即引物、酶、dNTP、模板和Mg<sup>2+</sup>

**引物：**引物是PCR特异性反应的关键，PCR产物的特异性取决于引物与模板DNA互补的程度。理论上，只要知道任何一段模板DNA序列，就能按其设计互补的寡核苷酸链做引物，利用PCR就可将模板DNA在体外大量扩增。设计引物应遵循以下原则：

- ①引物长度： 15-30bp，常用为20bp左右。
- ②引物扩增跨度： 以200-500bp为宜，特定条件下可扩增长至10kb的片段。
- ③引物碱基： G+C含量以40-60%为宜，G+C太少扩增效果不佳，G+C过多易出现非特异条带。ATGC\*随机分布，避免5个以上的嘌呤或嘧啶核苷酸的成串排列。
- ④避免引物内部出现二级结构，避免两条引物间互补，特别是3'端的互补，否则会形成引物二聚体，产生非特异的扩增条带。
- ⑤引物3'端的碱基，特别是最末及倒数第二个碱基，应严格要求配对，以避免因末端碱基不配对而导致PCR失败。

⑥引物中有或能加上合适的酶切位点，被扩增的靶序列\*有适宜的酶切位点，这对酶切分析或分子克隆很有好处。

⑦引物的特异性：引物应与核酸序列数据库的其它序列无明显同源性。

引物量：每条引物的浓度0.1~1 $\mu$ mol或10~100pmol，以\*引物量产生所需要的结果为好，引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增，且可增加引物之间形成二聚体的机会。

#### 试剂盒组成及试剂配制：

1. 酶联板 (Assay plate)：一块 (96孔)。
2. 标准品 (Standard)：2瓶 (冻干品)。
3. 样品稀释液 (Sample Diluent)：1 $\times$ 20ml/瓶
4. 生物素标记抗体稀释液 (Biotin-antibody Diluent)：1 $\times$ 10ml/瓶。
5. 辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液 (HRP-avidin Diluent)：1 $\times$ 10ml/瓶。
6. 生物素标记抗体 (Biotin-antibody)：1 $\times$ 120  $\mu$ l/瓶 (1: 100)
7. 辣根过氧化物酶标记亲和素 (HRP-avidin)：1 $\times$ 120  $\mu$ l/瓶 (1: 100)
8. 底物溶液 (TMB Substrate)：1 $\times$ 10ml/瓶。
9. 浓洗涤液 (Wash Buffer)：1 $\times$ 20ml/瓶，使用时每瓶用蒸馏水稀释25倍。
10. 终止液 (Stop Solution)：1 $\times$ 10ml/瓶 (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。

#### 样本处理及要求：

1. 血清：全血标本请于室温放置2小时或4 $^{\circ}$ C过夜后于1000g离心20分钟，取上清即可检测，或将标本放于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C保存，但应避免反复冻融。
2. 血浆：可用EDTA或肝素作为抗凝剂，标本采集后30分钟内于2 - 8 $^{\circ}$ C 1000g离心20分钟，或将标本放于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C保存，但应避免反复冻融。
3. 组织匀浆：用预冷的PBS (0.01M, pH=7.4)冲洗组织，去除残留血液 (匀浆中裂解的红细胞会影响测量结果)，称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的PBS (一般按1:9的重量体积比，比如1g的组织样品对应9mL的PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂)加入玻璃匀浆器中，于冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎，或反复冻融。将匀浆液于5000 $\times$ g离心5~10分钟，取上清检测。
4. 细胞培养物上清或其它生物标本：1000g离心20分钟，取上清即可检测，或将标本放于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C保存，但应避免反复冻融。

#### 注意事项：

- 1、使用本试剂前请仔细阅读本说明书全文。
- 2、操作时应尽量少说话，因口腔中也含有支原体，可能引起样品污染，而造成假阳性；整个检测过程中，反应体系的配制、样本处理及加样、PCR扩增应分区域进行，以避免交叉污染。
- 3、实验时，试剂盒组分中的试剂使用前应充分融化并混匀 (混匀时禁止激烈振荡，只需要进行上下倒置多次进行混匀)。
- 4、反应管中加好所有的试剂后，应尽快上PCR仪进行扩增，以免形成过多的二聚体。
- 5、细胞培养物中含有青霉素和链霉素等抗生物素不会影响本品的检测结果。如果用户需要进一步提高检测。