肠道病毒通用型（EV-U）扩增检测试剂盒说明书

技术原理**：**

DNA的半保留复制是生物进化和传代的重要途径。双链DNA在多种酶的作用下可以变性解链成单链，在DNA聚合酶与启动子的参与下，根据碱基互补配对原则复制成同样的两分子挎贝。

 在聚合酶链式反应实验中发现，DNA在高温时也可以发生变性解链，当温度降低后又可以复性成为双链。因此，通过温度变化控制DNA的变性和复性，并设计引物做启动子，加入DNA聚合酶、dNTP就可以完成特定基因的体外复制。（ DNA高温变性低温复性）

 发现耐热DNA聚合同酶--Taq酶对于PCR的应用有里程碑的意义，该酶可以耐受90℃以上的高温而不失活，不需要每个循环加酶，使PCR技术变得非常简捷、同时也大大降低了成本，PCR技术得以大量应用，并逐步应用于临床。

特点优势：

 1.特异性：所有产品使用的引物均经过详尽的生物信息学分析，经过GenBank及自建庞大数据库的比对，确保所用的每一条引物均为种属或血清型特异的基因序列区段，可实现对细菌种属及血清型的特异检测，特异性均达到100%。

 2. 重现性：该系列所有产品均经过大量实验菌株的验证，重现性为100%。

 3. 灵敏性：该系列产品可实现对检测菌的高灵敏检测，当样品中细菌的浓度达到103cfu/ml时，可实现对其的直接检测，无需繁琐的增菌过程。

 4. 实用性：检测范围广，涵盖了对人体危害较为严重的17种呼吸道及肠道致病菌，可实现对临床样品及其他环境取样的快速检测，整个检测过程为3-4个小时。

 5. 优势1：序列资源丰富，除GenBank公布的序列外，公司还进行了大量菌株的序列破译，从理论上保证所选引物具有良好的保守性和特异性。

 6. 优势2：该系列试剂盒均经过大量的保守性及特异性实验验证，凭借公司拥有的丰富的菌种资源，每一种检测试剂盒均经过了20余种标准菌株和临床菌株的保守性验证及40余种近缘标准菌株和临床菌株的特异性验证，确保在使用过程中不会出现任何的假阳性及假阴性报告结果。

需要自备的器材：

1．方法仪器：分析天平、离心机、荧光 PCR 扩增仪、组织研磨器、-20 ℃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 经焦碳酸二乙酯（DEPC）水

处理的灭菌离心管、吸头（10 µL、200 µL、1000 µL）、灭菌双蒸水。

样本采集、存放及运输：

1、样本采集：各类型样本按照常规方法采集；

2、存放：样本在2~8℃条件下保存应不超过72h，-70℃以下可长期保存，但应避免反复冻融（zui多冻融3次）；

3、运输：采用泡沫箱加冰密封进行运输。

组成及试剂配制:

1、酶标板：一块（96孔）

2、 标准品（冻干品）： 2瓶，请临用前15分钟内配制。每瓶以样品稀释液稀释至0.5ml，盖好后室温静置大约10分钟，同时反复颠倒/搓动以助溶解，其浓度为200 U/L，然后做系列倍比稀释（注：不要直接在板中进行倍比稀释），分别配制成200 U/L，100 U/L，50 U/L，25 U/L，12.5 U/L，6.25 U/L，3.12 U/L，样品稀释液直接作为空白孔 0 U/L。如配制100 U/L标准品：取0.3ml （不要少于0.3ml ）200 U/L的上述标准品加入含有0.3ml样品稀释液的Eppendorf管中，混匀即可，其余浓度以此类推。

3、 样品稀释液：1×20ml。

4、 检测稀释液A：1×10ml。

5、 检测稀释液B：1×10ml。

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Mg2+

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0.1～1umol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。PCR实验步骤：

①产品仅用于科研取冻存已裂解的细胞，室温放置5分钟使其完全溶解。

②两相分离 每1ml的TRIZOL试剂裂解的样品中加入0.2ml的lvfang，盖紧管盖。手动剧烈振荡管体15秒后，15到30℃孵育2到3分钟。4℃下12000rpm离心15分钟。离心后混合液体将分为下层的红色酚lvfang相，中间层以及无色水相上层。RNA全部被分配于水相中。水相上层的体积大约是匀浆时加入的TRIZOL试剂的60%。

③RNA沉淀 将水相上层转移到一干净无RNA酶的离心管中。加等体积异丙醇混合以沉淀其中的RNA，混匀后15到30℃孵育10分钟后，于4℃下12000rpm 离心10分钟。此时离心前不可见的RNA沉淀将在管底部和侧壁上形成胶状沉淀块。

④RNA清洗 移去上清液，每1mlTRIZOL试剂裂解的样品中加入至少1ml的75%乙醇(75%乙醇用DEPCH2O配制)，清洗RNA沉淀。混匀后，4℃下7000rpm离心5分钟。

⑤RNA干燥 小心吸去大部分乙醇溶液，使RNA沉淀在室温空气中干燥5-10分钟。

⑥溶解RNA沉淀 溶解RNA时，先加入无RNA酶的水40μl用枪反复吹打几次，使其完全溶解，获得的RNA溶液保存于-80℃待用。 1)紫外吸收法测定先用稀释用的TE溶液将分光光度计调零。然后取少量RNA溶液用TE稀释(1:100)后，读取其在分光光度计260nm和280nm处的吸收值，测定RNA溶液 浓度和纯度。

PCR反应的特异性決定因素为

1.引物与模板DNA特异正确的结合。

2.碱基配对原则。

3. Tag DNA聚合酶合成反应的忠实性。

4.靶基因的特异性与保守性。

其中引物与模板的正确结合是关键。引物与模板的结合及引物链的延伸是遵循碱基配对原则的。聚合酶合成反应的忠实性及 Tag DNA聚合醇耐高温性,使反应中模板与引物的结合(复性)可以在较高的温度下进行,结合的特异性大大増加加,被扩増的靶基因片段也就能保持很高的正确度。再通过选择特异性和保守性高的靶基因区,其特异性程度就更高。

灵敏度高

PCR产物的生成量是以指数方式増加的,能将皮克(pg=10-129)量级的起始待測模板扩増到微克(ug=10-69)水平。能从100万个细胞中检出一个靶细胞;在病毒的检测中,PCR的灵敏度可达3个RFU(空斑形成单位);在细菌学中zu小检出率为3个细菌。

(3)简便、快速

PCR反应用耐高温的 Tag DNA聚合酶,一次性地将反应液加好后,即在DNA扩増液和水浴锅上进行变性退火-延伸反应,一般在2-4小时完成扩増反应。扩増产物一般用电泳分析,不一定要用同位素,无放射性污染、易推广。

(4)对标本的纯度要求低

不需要分离病毒或细菌及培养细胞,DNA粗制品及总RNA均可作为扩増模板。可直接用临床标本如血液、体腔液、洗嗽液、毛发、细胞、活PCR技术概论。

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。