A decorative border of green leaves and small white flowers surrounds the text. The leaves are in various shades of green and are arranged in a circular pattern. The white flowers are small and five-petaled, scattered among the leaves.

关于鼠疫检测新技术新方法

A decorative border of green leaves and white flowers surrounds the central text. The leaves are in various shades of green, and the flowers are small and white with yellow centers. The border is arranged in a roughly rectangular shape, with some leaves overlapping the text area.

一、核酸检测技术
(PCR检测)

二、标记检测技术
(ELISA, 胶体金)

一、核酸检测技术

定义：对动植物、微生物的基因序列进行测定。

内容：

核酸的分离与纯化

聚合酶链式反应(PCR技术)

核酸杂交技术

核酸的纯化与分离

目的：获得完整的核酸一级结构，并提高核酸纯度。

技术流程

破碎细胞（细菌）

核酸提取

核酸纯化

材料的前处理

↓

细胞破碎，核酸释放

↓

核酸分离、纯化

↓

沉淀或吸附核酸，去除杂质

↓

核酸溶解缓冲液



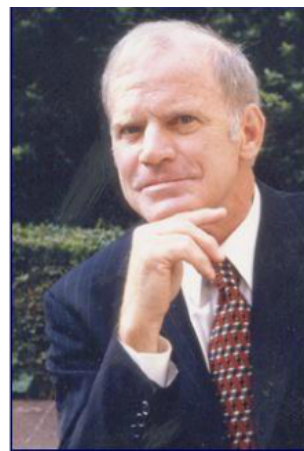
全自动核酸、蛋白提取仪

聚合酶链式反应（PCR技术）

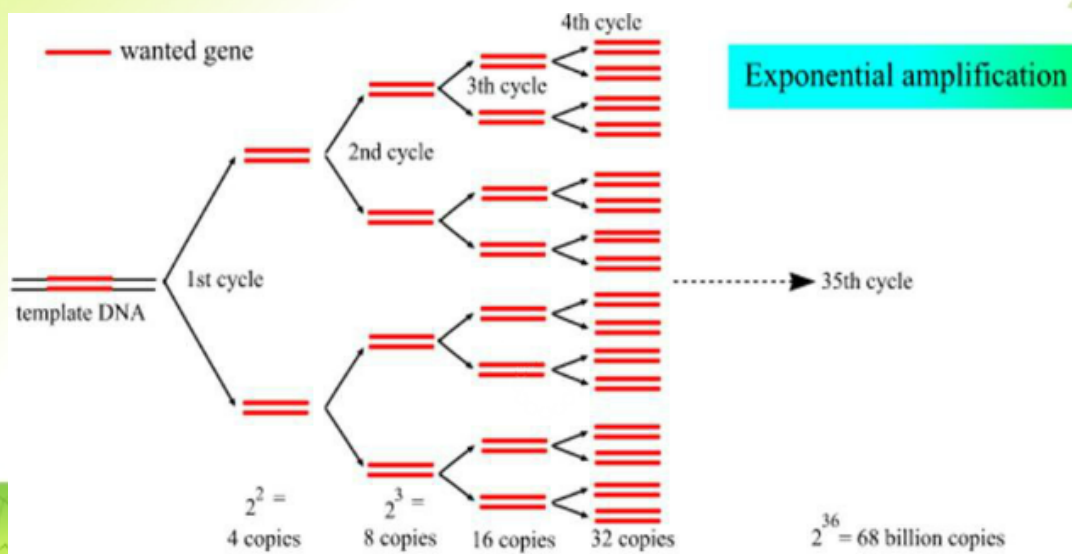
简史：

1971年，Khorana提出：DNA变性后，与合适引物进行杂交，在DNA聚合酶作用下，延伸引物，并不断重复该过程，即可克隆tRNA基因。

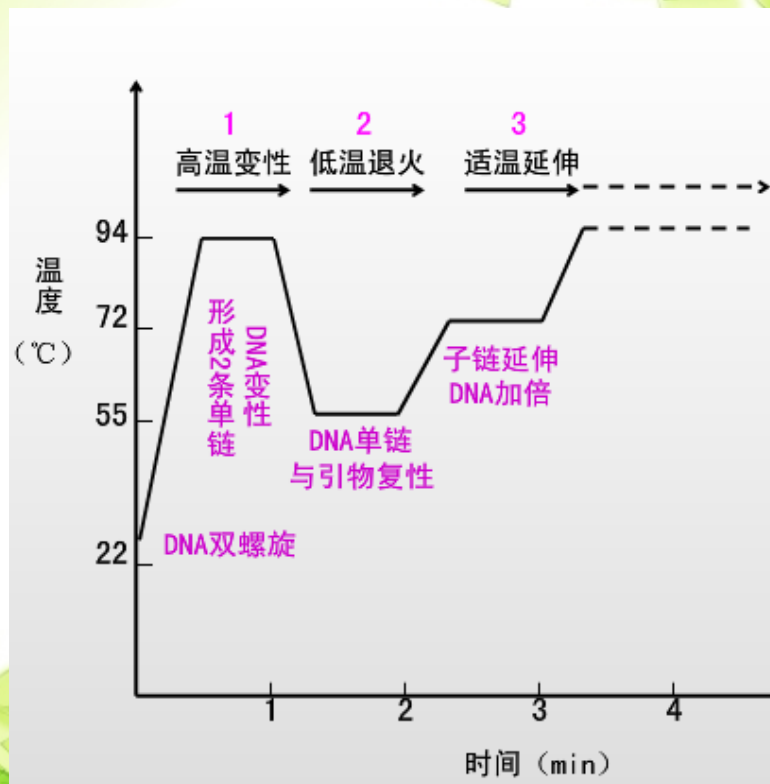
1985年，Mullis等人发明聚合酶链反应（PCR），随后，Mullis所属公司PE推出第一台PCR自动化热循环仪。



基本原理:



基本步骤



PCR反应五要素

- 1. 引物 (primer)
- 2. 酶 (Taq DNA polymerase)
- 3. dNTP
(dATP,dGTP,dCTP,dTTP)
- 4. 模板 (template)
- 5. Mg^{2+} (magnesium)



PCR仪



实时定量PCR仪

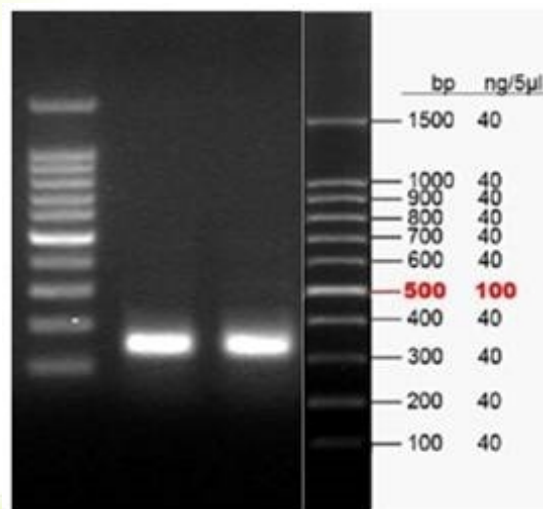


凝胶电泳系统



凝胶成像系统

PCR结果判定（凝胶电泳）



PCR类型:

1. 多重PCR
2. 巢式PCR
3. 定量PCR
4. 反向PCR
5. 逆转录PCR

PCR技术在鼠疫检测中的应用

鼠疫菌PCR检测法:

从疑似鼠疫的标本（全血、组织）中检测鼠疫菌，以鼠疫菌 *fra* 和 *pla* 基因片段作为PCR扩增目的片段。

鼠疫判定标准:

PCR扩增 (*fra* + *pla*) + 胶体金抗原检测 or 酶联免疫吸附试验
or 反相血凝试验 = 确诊鼠疫

鼠疫菌核酸检测样本处理

样本类别

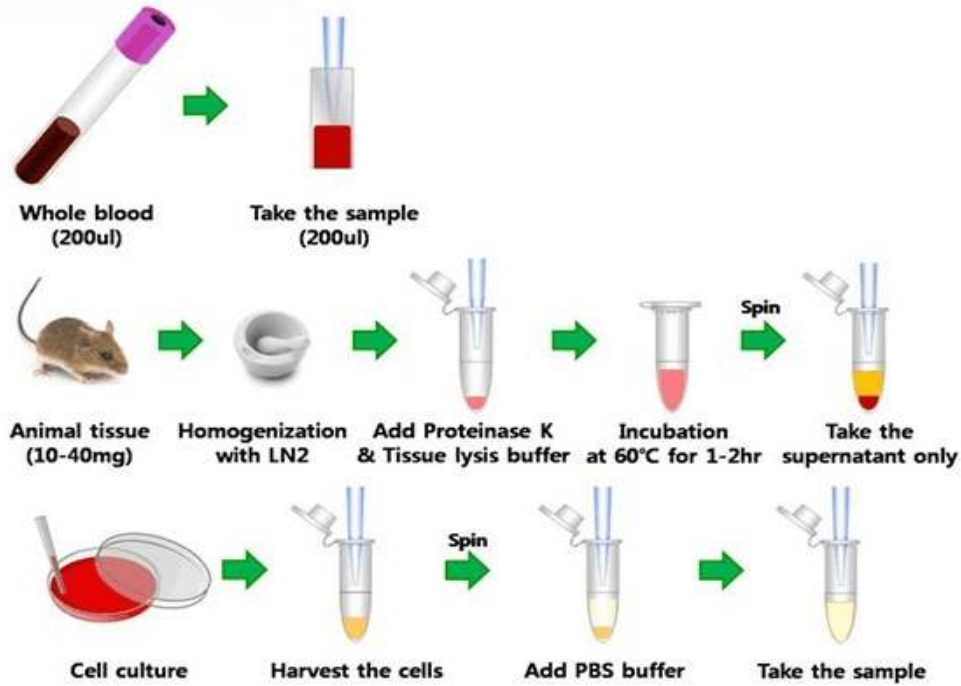
1. 鼠疫菌培养物
2. 鼠疫病人血液、痰液或尸检标本
3. 自毙或捕获动物血液或组织脏器（肝脏、脾脏等）
4. 媒介昆虫



样品处理方法

1. 煮沸法
2. DNA提取试剂盒
3. CTAB法
4. 氯仿抽提法

Pre-treatment steps



Genomic DNA Extraction



鼠疫菌PCR检测 反应体系

10 x buffer

dNTPs

Fra-F (5'-GGAACCACTAGCACATCTGTT-3')

Fra-R (5'-ACCTGCTGCAAGTTTACCGCC-3')

Pla-F (5'-ACTACGACTGGATGAATGAAAATC-3')

Pla-R (5'-GTGACATAATATCCAGCGTTAATT-3')

Taq聚合酶

待检测模板 (基因组DNA)

去离子水

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/665101014022011132>