

【检测原理】

本试剂盒根据荧光 PCR 技术原理，针对 PCR 试剂盒设计特异性引物和 Taqman 探针，通过荧光 PCR 检测仪进行检测，从而实现 PCR 试剂盒的检测。

【储存条件及有效期】

1. 避光-20℃储存，有效期 12 个月。
2. 低温运输不能超过 4 天；开封后避光-20℃储存，对有效期没有影响。避免反复冻融，冻融 6 次不影响检测效果。
3. 生产日期、有效期至：见外包装盒。

【适用仪器】

适用于 ABI 7500、Bio-Rad CFX96、Roche480 等全自动荧光PCR 检测仪。

【样本要求】

1. 样本种类：鼻/咽拭子、痰液、支气管肺泡灌洗液；培养物等样品。
2. 保存条件：采集的标本应及时送检，24 小时内检测的应 4℃保存，超过 24 小时的最好-70℃保存，并避免反复冻融。

【检测方法】**1. 试剂准备（试剂准备区）**

将试剂盒各组份置 4℃避光融化，充分混匀后瞬间离心。计算试剂使用份数 N（N=样本数+1 管阳性对照+1 管阴性对照），根据下表配置反应体系 mix，加入一适当体积离心管中，充分混匀后瞬间离心，按 20μL 分装至 PCR 反应管/板，并转移至样本处理区。

组分	体积（μL）
qPCR 预混液（含酶）	16
引物探针	4
总体积（反应体系 mix）	20

2. 样本处理（样本处理区）**① 核酸提取**

选择合适的核酸提取试剂盒提取核酸，具体按照相应的试剂盒说明书操作。

② 加样

在已加入反应体系 mix 的 PCR 反应管/板上分别加入处理好的待检标本核酸、阴性对照、阳性对照各 5μL，终体积为 25μL。

盖紧管盖或封膜，瞬间低速离心后置荧光 PCR 检测仪扩增。

3. 扩增检测（核酸扩增区）

步骤	温度	时间	循环数
----	----	----	-----

①预变性	95℃	5min	1cycle
②变性	95℃	10s	40cycles
退火/延伸/检测荧光*	55℃	40s	

*步骤②中 55℃时荧光检测，检测通道为 FAM。*ABI 系列荧光 PCR 仪不选 ROX 校正，淬灭基团选 None。

4. 结果分析根据分析后图像调节起止值，（建议起始设在 3~15、终止设在 5~20，同时调整阴性对照的扩增曲线平直或低于阈值线），点击分析，在报告界面查看结果。

【质量控制】

1. 阴性对照：Ct 值>38 或未检出。
2. 阳性对照：扩增曲线呈 S 型，且 Ct 值≤30。
3. 同一实验以上要求需同时满足，否则本次实验视为无效。
4. 每种检测靶标都需设阴阳对照，不同的靶标根据对应阴性调整基线阈值。

【结果判读】

1. FAM 通道检测 B 组链球菌。
2. 阴性：Ct 值>38 或未检出。
3. 阳性：扩增曲线呈 S 型，且 Ct 值≤35。
4. 可疑：扩增曲线呈 S 型，且 35<Ct 值≤38，需复检；复检结果若一致，判定结果为阳性。

【检验方法的局限性】

1. 样品采集、运输、保存不当，试剂运输、保存、配置不当都可能会影响实验结果，甚至会导致假阴性结果。
2. 如果实验室污染、试剂污染、样品交叉污染，可能出现假阳性结果。

【注意事项】

1. PCR 操作各阶段应严格分区操作，避免交叉污染。
2. 试剂盒各组分使用前应充分融化混匀，离心数秒后使用。
3. 各组分不得与其他产品或不同批号的相应成分进行互换。
4. 待测标本若不及时检测，应保存于-20℃或-70℃。
5. 样品的处理应该严格按照生物安全规范操作。
6. PCR 操作人员应具有经验和受过专业培训。
7. 本试剂盒仅用于科研使用，不做为临床诊断使用。