

【预期用途】

本产品就是以探针法荧光定量PCR技术为基础开发的专门指标的试剂盒。

【检验原理】

本试剂盒即开即用，用户只需要提供样品DNA模板，引物和探针经过优化，灵敏性高，提供阳性对照，便于区分假阴性样品，特异性高，引物是根据指标DNA高度保守区设计，不会跟其他微生物的DNA发生交叉反应，既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为5个数量级，本产品足够50次20 μ L体系的探针法荧光定量PCR反应。

【试剂组成】

| 名称 | 规格 |
|--|-------------------------|
| 2 \times Probe qPCR MasterMix | 0.5 mL \times 1管 |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 1 mL \times 1管 |
| 超纯水 | 1 mL \times 1管 |
| 探针法PCR引物-混合液 | 150 μ L \times 1管 |
| 探针法PCR阳性对照(1 \times 10E7拷贝/ μ L) | 50 μ L \times 1管 |

说明：不同批号的试剂盒组分不可交互使用。

【运输及保存】

低温运输，-20 $^{\circ}$ C保存，保存期限为12个月。

【自备试剂】

样品DNA。

【适用仪器】

ABI、安捷伦MX3000P/3005P、LightCycler、Bio-Rad、eppendorf等系列荧光定量PCR检测仪。

【使用方法】**1. 试剂准备（试剂准备区）**

稀释标准曲线样品（以10E1-10E6拷贝/ μ L这6个10倍稀释度为例）。

由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分）。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供无传染性的DNA片段作为阳性对照。

1. 标记6个离心管，分别为6，5，4，3，2，1。
2. 用带芯枪头分别加入45 μ L荧光PCR专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同。
3. 在6号管中加入5 μ L 1 \times 10E7拷贝/ μ L的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得1 \times 10E6拷贝/ μ L的标准曲线样品。放冰上待用。

4. 换枪头，在5号管中加入5 μL 1×10E6拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E5拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。

5. 换枪头，在4号管中加入5 μL 1×10E5拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E4拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。

6. 重复上面的操作直到得到6个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

2. 样本处理（样本处理区）

2.1如果有N个样品，最好设置N+2个提取，多出的一个是PC（样品制备阳性对照），一个是NC（样品制备阴性对照）。可以用10μL上步所得4号稀释液再加上一定量的水使总体积跟核酸制备试剂盒所要求的起始样本体积一样，以此作为PC。另外用水作为NC。

2.2 核酸提取：核酸提取可以采用上海抚生实业有限公司的核酸提取或纯化试剂，操作方法按照说明书进行。

3.Probe qPCR反应（20μL体系，在样品制备室进行）

3.1如果做定量分析并且只做1次重复，则标记N+9个PCR管，其中N+2个用于上步得到的N+2个样品，1个用于PCR阴性对照（用水做模板），6个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做1次重复，则标记N+4个PCR管，其中N+2个用于上步得到的N+2个样品，1个用于PCR阴性对照（用水做模板），1个用于PCR阳性对照（直接用第6步第4号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后最后加）：

| 成分 | 样品管 N+2个 | PCR阴性对照 | 标准曲线样品管 (1-6管) |
|------------------------|-------------|---------|--------------------------|
| 2×Probe qPCR MasterMix | 各10 μL | 10 μL | 各 10 μL |
| 探针法PCR引物-混合液 | 各3 μL | 3 μL | 各 3 μL |
| N+2个待测DNA样本 | 7 μL | - | - |
| 超纯水 | - | 7 μL | - |
| 第6步所得标准曲线样品稀释液（1-6号） | - | - | 各7μL（2号样到2号管，3号样到3号管...） |

盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR:

| 过程 | 温度 | 时间 |
|----|----|----|
| | | |

| | | |
|------------------|------|---|
| 预变性 | 95°C | 2min |
| PCR反应 (45个循环) | 95°C | 15sec |
| | 58°C | 30 sec (采集FAM通道的 荧光信号, 设置BHQ-1为 淬灭基团) |

【结果判定】

1. 如果把本试剂盒用于定量检测, 则以阳性对照浓度的log值为横轴, 以Ct值为纵轴, 绘制标准曲线。再以待测样品的Ct值从标准曲线上推算出样品核酸浓度的log值, 再推算出其浓度。
2. 如果把本试剂盒用于定性检测, 只判断阳性或阴性, 则阴性对照Ct必须大于或等于40。阳性对照必须有荧光对数增长, 有典型扩增曲线, Ct值应该小于或等于39。对待测样品, 如果其Ct大于或等于40则为阴性, 如果小于或等于39则为阳性。如果在39-40之间, 则重复一次。重复实验的Ct值如果大于或等于40则为阴性, 如果小于40, 则为阳性。

【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°C或-70°C。
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。