

【预期用途】

本产品就是以染料法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测的试剂盒。

【检验原理】

本试剂盒可在一次反应中快速检测五种病原体：肺炎链球菌 1 型、3 型、4 型、5 型、6 型。肺炎链球菌的血清型分类是基于其荚膜多糖抗原结构的差异，目前已发现的血清型超过 100 种。不同血清型在致病力、流行特点、好发人群和引起的疾病类型上存在显著差异。1 型和 5 型是经典的致病菌，在成人和儿童中均占有重要地位，且与脓胸等并发症相关。3 型因其独特的生物学特性而成为毒力最强的血清型，需要警惕其导致的高病死率。型属于常见致病血清型，广泛存在于各类感染中。6 型（特别是 6B）则是儿童感染的“主力军”，且耐药问题较为突出。根据探针法荧光定量 PCR 原理开发。

【试剂组成】

名称	规格
2 × Probe qPCR Mix	700 μ L×1管
ddH ₂ O	1 mL×1 管
五重 qPCR 引物混合液	200 μ L×1 管
五重 qPCR 探针混合液	110 μ L×1 管
五重 qPCR 阳性对照(1×10E8 拷贝/ μ L)	50 μ L

说明：不同批号的试剂盒组分不可交互使用。

【运输及保存】

避光-20±5℃保存，有效期12个月。开封后避光-20±5℃保存，对有效期没有影响；

冰袋低温运输4天、反复冻融5次对效期没有影响。

【自备试剂】

样品 DNA。

【适用仪器】

ABI、安捷伦MX3000P/3005P、LightCycler、Bio-Rad、ependorf等序列荧光定量PCR检测仪。

【使用方法】

一、核酸提取(样本制备区)

用自选方法是提取样品 DNA，本试剂盒跟市场上大多数核酸提取试剂盒兼容。

二、稀释阳性对照样品(样本制备区)

(由于阳性对照浓度高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，避免污染样品或本试剂盒的其他成分)。

1. 标记 6 个离心管，分别为 7, 6, 5, 4, 3, 2。

2. 用带滤芯头分别加入 45 μ L ddH₂O，(最用带滤芯头，下同)。

- 在7号管中加入5 μL 1×10^8 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供),充分震荡1分钟,得 1×10^7 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放水上待用。
- 换枪头,在6号管中加入5 μL 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡1分钟,得 1×10^6 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放水上待用。
- 换枪头,在5号管中加入5 μL 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡1分钟,得 1×10^5 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放水上待用。
- 重复上面的操作直到得到6个稀释度的标准曲线样品。放水上待用。

若无条件作标准曲线,将阳性对照稀释到 1×10^5 拷贝/ μL 即可。

三. 试剂配制(试剂准备区)

准备足量的qPCR管(样品管、阴性对照管、阳性对照管),向各qPCR管中分别加入下列成分。:

成分	N个 待检样品管	qPCR 阴性对照管	qPCR 阳性对照管
2 × Probe qPCR Mix	各 125 μL	125 μL	125 μL
五重 qPCR 引物混合液	各 4 μL	4 μL	4 μL
五重 qPCR 探针混合液	各 2 μL	2 μL	2 μL
ddH ₂ O	各 4.5 μL	4.5 μL	4.5 μL

转移至扩增反应区

四. 添加模板(模板添加区)

向qPCR管中分别加入2 μL 模板,顺序为阴性对照(ddH₂O)、待测样品模板、五重qPCR阳性对照,离心30秒,立即进行扩增反应。

五. 扩增反应(扩增及产物分析区)

将qPCR管放置在qPCR扩增仪样品盘相应位置,进行扩增,扩增身教如下:

过程	温度	时间
预变性	95°C	3 min
qPCR 反应 (40个循环)	95°C	15sec
	60°C	20sec
信号通道	同时选择 FAM/HEX/ROX/Cy5 通道采集荧光信号	

荧光基团和淬灭基团选择如下表:

Target	荧光基团	淬灭基团
肺炎链球菌 1 型	FAM	MGB
肺炎链球菌 3 型	HEX	None
肺炎链球菌 4 型	ROX	MGB
肺炎链球菌 5 型	Cy5	MGB

肺炎链球菌6型	Cy5.5	BHQ2
---------	-------	------

【结果判定】

1. 如果制作标准曲线, 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 DNA 浓度的 log 值, 推算出其浓度。

2. 如果未制作标准曲线, 按照如下标准判定结果:

阳性对照结果: Ct 值 < 30, 有明显指数增长, 呈典型的 S 型曲线。

阴性对照结果: Ct 值 > 38 或无 Ct 值, 无明显指数增长期和平台期。

样本检测结果: Ct 值 < 35, 有明显指数增长, 表明样本中检测出该菌种, 结果为阳性; Ct 值 > 38 或无 Ct 值, 表明样本中未检测出该菌种, 结果为阴性; Ct 值在 35-38 范围, 应对样本进行了复检, 如重复实验结果 Ct 值仍在 35-38 范围, 有明显指数增长, 则判定为阳性, 否则为阴性。

【注意事项】

1. 所有操作严格按照说明书进行;
2. 试剂盒内各种组分使用前应自然融化, 完全混匀并短暂离心;
3. 反应物应避光保存;
4. 反应中尽量避免气包存在, 管盖需盖紧;
5. 使用一次性吸头、一次性手套和各区专用工作服;
6. 样本处理、试剂配制、加样需在不同区进行, 以免交叉污染;
7. 实验完毕后用 10%次氯酸或 75%酒精或紫外灯处理工作台和移液器;
8. 试剂盒里所有物品应视为污染物对待, 并按照《微生物医学实验室生物安全通则》进行处理。

”