

鼠疫杆菌(YP)核酸扩增检测试剂盒(PCR-三色荧光探针法)

【产品名称】

通用名称：鼠疫杆菌(YP)核酸扩增检测试剂盒(PCR-三色荧光探针法)

Name : Diagnostic Kit for Yersinia Pestis DNA
(PCR tripartite Fluorescence Probing)

【包装规格】48T/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于检测全血等样本中的鼠疫杆菌,用于鼠疫杆菌感染的辅助诊断,其检测结果仅供参考。

【检验原理】

本试剂盒用一对 PLA 基因特异性引物,一对 3A 基因特异性引物,一对 伪 CAFL 基因特异性引物,分别结合一条特异性荧光探针,用三色荧光 PCR 技术对鼠疫杆菌(YP)DNA 进行体外扩增,用于临床上对可疑感染者的病原学诊断。

【试剂组成】

名称	规格
核酸提取液	1.5ml×2 管
酶液	50μl×1 管
YP 反应液	1.0ml×1 管
YP 阳性质控品	50μl ×1 管
阴性质控品	250μl ×1 管

说明：不同批号的试剂盒组分不可交互使用。

【储存条件和有效期】

试剂盒保存于-20±5℃,有效期 12 个月;

避免反复冻融,冻融次数不超过 5 次;试剂开瓶后,在室温条件下放置时间不应超过 8 小时;运输采用干冰(或者冰袋)保持低温,运输时间不应超过 4 天。试剂盒生产日期见产品标签。

【适用仪器】

ABI 7300、7500、ABI stepone / stepone plus、安捷伦 MX3000P/3005P、MJ Opticon2 等其他荧光定量 PCR 检测仪。

【标本要求】

标本采集：用注射器取血 5mL 至 EDTA-2Na 抗凝管

保存运输：上述标本短期内可保存于-20℃,长期保存可置-70℃,但不能超过 6 个月,标本运送应采用 2~8℃冰袋运输,严禁反复冻融。

【使用方法】

1. 样品处理 (样本处理区)

1.1 样本前处理

取抗凝血下层血细胞 50uL,加入 100uL 双蒸水吹匀

1.2 DNA 提取

- 1) 对上述处理好的标本加入等体积核酸提取液(固体标本加入 50uL 核酸提取液),100℃恒温处理 10 分钟,13,000 rpm 离心 5 分钟,取上清液转移至新的 1.5ml EP 管,-20℃保存;
- 2) DNA 的提取也可以采用广州维伯鑫生物科技有限公司生产的 DNA 提取试剂盒(离心柱提取法),请严格按照试剂盒说明书进行操作。

2. 试剂配制 (试剂准备区)

根据待检测样本总数,设所需要的 PCR 反应管数为 N(N=样本数+1 管阴性对照+1 管阳性对照;样品每满 7 份,多配制 1 份),每测试反应体系配制如下表:

试剂	YP 反应液	酶液
用量(样本数为 N)	20μl	1μl

3. 加样 (样本处理区)

将步骤 1 提取的 DNA、阳性质控品、阴性质控品各取 4μl,分别加入相应的反应管中,盖好管盖,混匀,短暂离心。

4. PCR 扩增 (核酸扩增区)

4.1 将待检测反应管置于荧光定量 PCR 反应槽内;

4.2 设置好通道、样品信息,反应体系设置为 25ul;

荧光通道选择:检测通道(Reporter Dye) FAM,淬灭通道(Quencher Dye) NONE,请勿选择 ROX 参比荧光。

4.3 推荐循环参数设置:

步骤	循环数	温度	时间	收集荧光信号
1	1 cycle	95℃	10min	否
2	40 cycle	94℃	15sec	否
		55℃	30sec	是

5. 结果分析判定

5.1 结果分析条件设定

设置 Baseline 和 Threshold:一般直接按机器自动分析的结果分析,当曲线出现整体倾斜时,根据分析后图像调节 Baseline 的 start 值(一般可在 3~15 范围内调节)、stop 值(一般可在 5~20 范围内调节),以及 Threshold 的 Value 值(上下拖动阈值线至高于阴性对照),重新分析结果。

5.2 结果判断

FAM 通道为 PLA 基因检测结果,CY5 通道为 3A 基因检测结果,VIC 通道为 CAFL 基因检测结果。

1) 阳性:检测样本任意一个通道 Ct 值三个小于等于 35.0,且曲线有明显的指数增长期;

2) 可疑:检测样本任意一个通道 Ct 值大于 35.0 且小于 40.0,重复一次实验,如果 Ct 值仍小于 40.0,且曲线有明显的指数增长期,为阳性,否则为阴性;

3) 阴性:三个通道均检测不到样本 Ct 值。

6. 检测方法的局限性

- > 样本检测结果与样本收集、处理、运送以及保存质量有关;
- > 样本提取过程中没有控制好交叉污染,会出现假阳性结果;
- > 阳性对照、扩增产物泄漏,会导致假阳性结果;
- > 病原体在流行过程中基因突变、重组,会导致假阴性结果;
- > 不同的提取方法存在提取效率差异,会导致假阴性结果;
- > 试剂运输,保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降,出现假阴性或定量检测不准确的结果;
- > 本检测结果仅供参考,如须确诊请结合临床症状以及其他检测手段。

7. 质控标准

阴性质控品:无明显扩增曲线或无 Ct 值显示;

阳性质控品:扩增曲线有明显指数生长期,且 Ct 值≤32;

以上条件应同时满足,否则实验视为无效。

8. 产品性能指标

阴阳性参考品符合率:8 份阳性参考品符合率为 100%;10 份阴性参考品符合率为 100%。

最低检测限:2.0×10²copies/ml。

精密度:批内、批间精密度检测 Ct 值的变异系数(CV)均≤3%。

【注意事项】

- > 所有操作严格按照说明书进行;
- > 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;
- > 反应液应避光保存;
- > 反应中尽量**避免气泡存在**,管盖需盖紧;
- > 使用一次性吸头、一次性手套和各区专用工作服;
- > **样本处理、试剂配制、加样需在不同区进行**,以免交叉污染;
- > 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;
- > 试剂盒内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。

【生产企业】

企业名称:广州维伯鑫生物科技有限公司

邮编:510663

生产地址:广州黄埔区科丰路 31 号华南新材料创新园 G11 栋 2 层

电子邮箱:info@vipotion.com

电话:020-66377266

公司网址:http://www.vipotion.com

传真:020-66377267