



荧光定量PCR结核分枝杆菌（TB）检测试剂盒

PCR-Fluorescence Diagnostic Kit for Mycobacterium tuberculosis
使用说明书

【前言】

本试剂盒采用聚合酶链式反应(PCR)结合Taqman荧光探针技术对分泌物拭子中的淋球菌(Mycobacterium tuberculosis)的特异性DNA核酸片段进行检测,本品对TB的检测灵敏度为10个病原体/ml。(供研究使用)。

【规格】 20 人份, -20℃保存,有效期6个月

【试剂盒组成】

1	核酸提取液	600ul	5	阴性对照(TB)	10ul
			6	TB定量阳性对照1号 1.0×10^6 copy/ml	10ul
3	TB PCR反应液	480 μ l	7	TB定量阳性对照2号 1.0×10^5 copy/ml	10ul
4	混合酶	40 μ l	8	TB定量阳性对照3号 1.0×10^4 copy/ml	10ul

【适用仪器】

本试剂盒适用于PE5700、7700、LightCycler、FTC-2000等荧光PCR仪。

【样本采集和处理】

自备试剂4%NaOH、灭菌生理盐水

1. 采集:以清晨第一口痰为宜。先用清水漱口,嘱患者用力咳出深部的痰于无菌样本保存管,密封,即可送检。

2. 存放:待测样本在2-8℃保存不应超过24小时;

3. 首先对痰液样本进行目测,若样本中唾液占绝大部分,则需重新采集样本。

4. 目测合格后,在样本中加入2~3倍体积4%的NaOH溶液,置于摇床上,在150rpm、37℃条件下处理30min或常温下1Hr,使其充分液化(无明显固状物并且吸出时无拖丝现象即为液化完全;若液化不完全,可适当再加入少量4%的NaOH溶液直至液化完全)。

5. 取液化后500-1000 μ l样本(冻存标本使用前在室温溶解,旋涡振荡10秒),15,000rpm离心10分钟,用移液器吸弃上清,往沉淀中加入1ml灭菌生理盐水,振荡悬浮(注意:按紧离心管盖后,横向按在旋涡振荡器上将沉淀振起),15,000rpm离心10min,再弃上清;再加入1ml灭菌生理盐水洗涤振荡沉淀,15,000rpm离心10min,弃上清,保留沉淀。在上述离心沉淀中加入30 μ l核酸提取液,振荡器上振荡10秒后100℃沸水浴10分钟后,15,000rpm离心10分钟,取上清液4ul做PCR扩增。

【试剂准备】

按样品数(样品数=血清标本数+对照品数+定量阳性对照3个)n取TB PCR反应液n \times 24ul、混合酶n \times 2ul混于一离心管中,旋涡振荡器上振荡混匀10秒,按每管26ul分装于反应管中。将上述处理好的标本上清液和定量阳性对照1至3号(务必振荡混匀数秒)各取4ul分别加入反应管中,混匀,低速离心数秒,立即进行PCR扩增反应。

【PCR扩增】

FTC2000、PE5700、7700、icycler荧光仪的程序设置:

37℃反应2分钟,然后93℃保温5分钟,再按93℃30秒 \rightarrow 55℃30秒 \rightarrow 72℃40秒循环40次。

lightcycler荧光仪的程序设置:

反应管置于LightCycler自动荧光PCR仪上,37℃反应2分钟,93℃2分钟,再按93℃5秒 \rightarrow 55℃10秒 \rightarrow 72℃20秒循环40次,每个循环的升降温速率为20℃/S,每个循环在60℃30秒处进行荧光检测设置。



【结果分析与判断】

1、 基线设定

1.1 PE5700、7700、FTC2000:

分析前把参比荧光定为TAMRA, 如果没有Ct<16的强阳性标本, 就选3-15个循环的平均荧光信号为基线分析; 如果有Ct<16的强阳性标本, 就将此标本定为TB DNA>10¹⁰ copy/ml, 并将此样品从数据库中剔除, 再以3-15个循环的平均荧光信号为基线再分析Ct。

1.2 iCycler

基线一般按照自设值(2-10)即可, 在实验结束后, 选择PCR baseline subtract选项扣除基线值。若某些曲线出现了规则的剧烈的跳动, 应视为非正常情况, 将其从结果中剔除(击活select wells, 将此孔彩色点去, 然后选择display wells)并注意调整坐标, 使所有曲线都在坐标以内。

1.3 lightcycler

用荧光记数值F1/F2读取结果。基线设定原则以超过正常阴性对照扩增曲线的最高点, 且Ct值不出现任何数值为准(一般在0.001-0.05范围内)。

2、 阈值设定

以刚好高于阴性对照品的扩增曲线最高点, 且阴性对照品Ct=40或0为原则, 调整起始阈值。

其它相关检测试剂盒:

荧光定量PCR沙眼衣原体(CT)检测试剂盒

荧光定量PCR淋球菌(NG)检测试剂盒

荧光定量PCR解脲支原体(UU)检测试剂盒

荧光定量PCR人乳头瘤病毒(HPV-6, 11)检测试剂盒

荧光定量PCR乙型肝炎病毒(HBV)检测试剂盒

荧光定量PCR结核分枝杆菌(TB)检测试剂盒



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址: 上海市闵行区北桥镇吴河路 328 号 A 栋 2 楼

邮编: 201109

联系: 市场部

电话: 021-54460832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址: www.shinegene.org.cn

