

流脑 A,B,Y 群三重探针法荧光定量 PCR 试剂盒

Neisseria meningitidis Group A,B,Y Probe PCR Kit

目录号: **ml108073**

使 用 说 明 书

产品及特点

脑膜炎奈瑟菌 (Neisseria meningitidis, Nm) 是世界范围内主要的流行病原菌之一，是导致流行性脑膜炎（简称流脑）的主要因素之一，严重时还能造成脑膜炎球菌败血症、血管炎及各种神经系统后遗症。人类是 Nm 唯一易感宿主，主要通过说话、打喷嚏等飞沫直接从空气传播，使 Nm 进入呼吸道而引起感染。Nm 根据其荚膜多糖抗原表位的不同，分为 A、B、C、D、29E、H、I、K、L、W135、X、Y 和 Z 共 13 个血清群的菌群，其中 A、B、C、W135、Y 这 5 个血清群引起的疾病占全世界范围内流行菌群侵袭性发病率的 90% 以上。本产品就是以三重探针法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测脑膜炎 A、B、Y 群试剂盒，**它具有下列特点：**

1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板。
2. 根据脑膜炎 A/B/Y 保守区域设计引物，灵敏度均在 100 拷贝/反应左右。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。

	4. 快速，整个检测过程（按一个样品计）所需时间仅为 2.0 小时。 5. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。 6. 本产品只能用于科研。	
规格及成分	成分	包装材料
	2 $\times$ Probe qPCR MagicMix	500 μ L (本色盖)
	荧光 PCR 专用模板稀释液	1 mL (绿色盖)
	流脑 A,B,Y 群探针法 qPCR 引物- 探针混合液	150 μ L (棕色管)
	流脑 A,B,Y 群探针法 qPCR 阳性对照 (1 $\times$ 10E7 拷贝/ μ L)	50 μ L (黄色盖)
	使用手册	1 份
使用方法	一、稀释 PCR 阳性对照 (以 10E1-10E6 拷贝/μL 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。本阳性对照由流感 A、B 和 Y 群专一性的三种 DNA 片段组成。 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 45μL 荧光 PCR 专用模板稀释液（用带芯枪头，下同）。 3. 在 6 号管中加入 5μL 1$\times$10E7 拷贝/μL 的阳性对照（试剂盒提供），充分震荡 1 分钟，得 1$\times$10E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。 4. 换枪头，在 5 号管中加入 5μL 1$\times$10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1$\times$10E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。换枪头，在 5 号管中加入 5μL 1$\times$10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1$\times$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 μ L 1 $\times$ 10E5 拷贝/ μ L 的阳性对照（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L 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。放冰上用。

二、样品 DNA 的制备

7. 如果有 N 个样品，必须设置 N+2 个提取，多出的一个是样品制备 PC（样品制备阳性对照），一个是样品制备 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10 μ L 阳性对照的 10000 倍稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为样品制备 PC。另外用水作为样品制备 NC。

8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容。

三、Probe qPCR 反应（20 μ L 体系，在样品制备室进行）

9. 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（用第 4 号管中的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为描述操作步骤，

10. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复。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加）：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对 照管	标准曲线 样品管 (1-6) 管)
2 $\times$ Probe qPCR MagicMix	10 μ L	10 μ L	各 10 μ L
流脑 A,B,Y 群探针法 qPCR 引物- 探针混合液	4 μ L	4 μ L	各 4 μ L
待测样品 DNA 模板	6 μ L	不加	不加
超纯水	不加	7 μ L	不加

第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)

不加

不加

各 6 μ L

11. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 PCR:

过程	温度	时间
预热	50°C	2 min
预变性	95°C	10 min
qPCR 反应 (45 个循环)	95°C	15 sec
	60°C	1min (采集 FAM 通道的荧光信号) (采集 HEX 通道的荧光信号) (采集 ROX 通道的荧光信号)

说明: FAM 为 A 群专一性扩增, HEX 为 B 群专一性扩增, ROX 为 Y 群专一性扩增。

四、数据处理

12. 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 DNA 浓度的 log 值, 再推算出其浓度。一次实验可以得到三种靶分子的标准曲线, FAM 通道得到的数据是 A 群的, HEX 通道得到的数据是 B 的, ROX 通道得到的数据是 Y 群。

13. 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 45。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 40。对待测样品, 如果其 Ct 大于或等于 45 则为阴性, 如果小于或等于 40 则为阳性。如果在 40-45 之间, 则重复一次。若重复结果 Ct 值小于 45, 扩增曲线有明显起峰, 该样本判断为阳性, 否则为阴性。一次实验可以得到三种靶分子的 Ct, FAM 通道得到的数据是 A 群的, HEX 通道得到的数据是 B 的, ROX 通道得到的数据是 Y 群。

自备试剂

样品 DNA。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。