

GNM衣原体DNA 检测试剂盒 说明书

货 号:

HCD0302-050(50T)

一、试剂盒简介

GNM 衣原体 (Chlamydia) 目前包括 11 种：流产衣原体 (C. abortus)、鸟衣原体 (C. avium)、豚鼠衣原体 (C. caviae)、猫衣原体 (C. felis)、禽衣原体 (C. gallinacea)、小鼠衣原体 (C. muridarum)、家畜衣原体 (C. pecorum)、肺炎衣原体 (C. pneumoniae)、鹦鹉热衣原体 (C. psittaci)、猪衣原体 (C. suis) 和沙眼衣原体 (C. trachomatis)。qPCR 法与普通 PCR 法相比，不仅可以进行定性分析，而且操作更为方便，更少受环境污染的影响。

本试剂盒采用了双重 qPCR 荧光探针技术，定量检测样品中所有衣原体 (Chlamydia) DNA。检测快速、灵敏度高、检测具有 100% 特异性，最低检测限可以达到 fg 水平。本试剂盒包含有外源性靶标的引物、探针和模板，通过外源性靶标检测结果来监测样本提取及试剂配制过程，避免假阴性结果。本试剂盒使用了 dUTP/UDG 防污染系统，可防止假阳性结果出现，保证结果准确性。

本试剂盒可搭配本公司核酸释放剂、支原体样品前处理试剂盒（磁珠法）试剂配套使用。

二、储存条件及有效期

1. 在避光-20±5°C条件下储存，有效期 12 个月。
2. 泡沫盒/箱加干冰或冰盒运输，开瓶后避光-20±5°C储存。
3. 产品批号，生产日期见外包装盒。

三、试剂盒规格及组分

组分名称	HCD0302-050(50T)	保存
2×qPCR Reaction Buffer	1 ML	-20±5°C
Chla Pri/Pro Mix	300μL	-20±5°C, 避光
阳性质控 (Chla PC)	100μL	-20±5°C
内部质控 (Chla IC)	100μL	-20±5°C
DNA 稀释液	1.5mL×2	-20±5°C

四、适用机型（包括但不限于）

ABI 7500 Real-Time PCR System、SLAN-96P/S 全自动医用 PCR 分析系统

五、相关设备耗材

一次性无尘手套、1.5ml 无菌低吸附离心管、qPCR 专用无菌无酶八联排管或 96 孔板、1000μL、100μL、10μL 移液器和无菌低吸附带滤芯枪头、荧光定量 PCR 仪、掌式离心机、涡旋混匀仪。

检测方法

实验流程 A（标准模式）

1. 待测样本的 DNA 准备

1.1 建议配套使用本公司“支原体样品前处理试剂盒（磁珠法）”，提取样本 DNA。

1.2 将试剂盒放置 2~8℃冰箱或冰上融化，涡旋混匀，瞬时离心。

2. qPCR 反应体系的准备

2.1 根据所要检测的样本数量，计算所需反应孔数，一般每个样本做 2 个重复孔。

反应孔数=（1个阳性质控 PC+1 个无模板对照 NTC+1 个提取阳性对照 PCS +1 个提取阴性对照 NCS+N 个待测样品）×2

2.2 将所需试剂放置冰上融化，根据反应孔数计算所需要反应混合液的总量。

反应混合液总量=（反应孔数+2）×20（2 为损失孔数）

按以下方案配置反应混合液。

表 1 反应混合液配置

组分	单孔用量/μL
2×qPCR Reaction Buffer	15
ChlaPri/Pro Mix	4
IC*	1
总体积	20

*若提取时未加入 IC，则按表 1 配置反应混合液；若提取时加入 IC，则在反应混合液中用 DNA 稀释液替代 IC。

3. 加样

充分旋涡混匀反应混合液，向每个反应孔加入 20μL 反应混合液及 10μL 待测核酸样品，如表 2 所示。

表 2 加样示例

反应孔	加样示例	反应孔体积
阳性质控 PC	20μL 反应混合液+10μL 阳性质控	30μL
无模板对照 NTC	20μL 反应混合液+10μL DNA 稀释液	30μL
提取阳性对照 PCS	20μL 反应混合液+10μL PCS 纯化液	30μL
提取阴性对照 NCS	20μL 反应混合液+10μL NCS 纯化液	30μL
待测样品	20μL 反应混合液+10μL 待测样品纯化液	30μL

注：①PCS 纯化液可使用 10 μ L PC+190 μ L 样品空白buffer（或者 1 \times PBS）作为样品进行前处理获得，或根据实验室情况调整；

②NCS 纯化液可使用 DNA 稀释液作为样品进行前处理获得。

4. qPCR 程序设置

以 ABI7500 为例：

4.1 新建实验，选择“Absolute Quantification”；

4.2 输入实验名称，选择 Quantitation-Standard Curve，TaqMan reagents 和 Standard 模式；

4.3 选择报告荧光基团，衣原体通道荧光基团为 FAM，猝灭基团为 None；IC 通道荧光基团为 VIC，猝灭基团为 None；参比荧光为 ROX；

4.4 设置 qPCR 反应程序为两步法：

表 3 qPCR 反应程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}$ C	5min	1
循环	95 $^{\circ}$ C	5s	45
	60 $^{\circ}$ C	30s	

反应体积选择 30 μ L，开始运行。

各实验室可根据所用机型进行设置反应程序。

实验流程 B（快速模式）

1. 待测样本的 DNA 准备

（A、建议配套使用本公司“核酸释放剂”，获得样本 DNA；B、以细胞样本为例，在实验前几天，细胞需在 24 孔培养板上，用无抗生素的培养基进行培养，待细胞生长至 80%以上开始试验。）

1.1 样品为细胞（优选方案）

- 1.1.1 弃去培养皿内的细胞培养基。
- 1.1.2 用 1×PBS 或者生理盐水洗 2 次细胞。
- 1.1.3 加入适量的核酸释放剂（以 24 孔板为例，每孔 100μL）裂解细胞，室温放置 5 分钟。
- 1.1.4 收集细胞裂解液，放入离心管中。
- 1.1.5 在离心机上 13000rpm 离心 5 分钟，上清转入一支新离心管。
- 1.1.6 取 2μL 上清作为模板进行 PCR 反应。

1.2 样品为培养上清（代替方案）

- 1.2.1 取 1~1.5mL 细胞培养上清（含有细胞或细胞碎片），放入离心管中。
- 1.2.2 在离心机上 13000rpm 离心 5 分钟。
- 1.2.3 弃上清，用 1×PBS 或者生理盐水洗沉淀一次。
- 1.2.4 加入 100 μL 裂解液裂解样品，上下颠倒混匀后，室温放置 5 分钟。
- 1.2.5 在离心机上 13000rpm 离心 5 分钟，上清转入一支新离心管。
- 1.2.6 取 2 μL 上清作为模板进行 PCR 反应。

2. qPCR 反应体系的准备

- 2.1 根据所要检测的样本数量，计算所需反应孔数，一般每个样本做 2 个重复孔。

$$\text{反应孔数} = (\text{1个阳性质控 PC} + \text{1个无模板对照 NTC} + \text{N 个待测样品}) \times 2$$

- 2.2 将所需试剂放置冰上融化，根据反应孔数计算所需要的反应混合液的总量。

$$\text{反应混合液总量} = (\text{反应孔数} + 2) \times 20 \quad (2 \text{ 为损失孔数})$$

按以下方案配置反应混合液。

表 4 反应混合液配置

组分	单孔用量/ μL
2 \times qPCR Reaction Buffer	15
ChlaPri/Pro Mix	4
IC	1
总体积	20

3. 加样

充分旋涡混匀反应混合液，向每个反应孔加入 20 μL 反应混合液及 10 μL 待测核酸样品，如表 5 所示。

表 5 加样示例

反应孔	加样示例	反应孔体积
阳性质控 PC	20 μL 反应混合液+10 μL 阳性质控	30 μL
无模板对照 NTC	20 μL 反应混合液+10 μL DNA 稀释液	30 μL
待测样品	20 μL 反应混合液+2 μL 待测样品+8 μL DNA 稀释液	30 μL

注：由“核酸释放剂”获得样本 DNA 样品，体积大于 2 μL 可能会产生 PCR 扩增抑制。

4. qPCR 程序设置

以 ABI7500 为例：

4.1 新建实验，选择“Absolute Quantification”；

4.2 输入实验名称，选择 Quantitation-Standard Curve，TaqMan reagents 和 Standard 模式；

4.3 选择报告荧光基团，衣原体通道荧光基团为 FAM，猝灭基团为 None；IC 通道荧光基团为 VIC，猝灭基团为 None；参比荧光为 ROX；

4.4 设置 qPCR 反应程序为两步法，如下表 6 所示。

表 6 qPCR 反应程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	5min	1
循环	95 $^{\circ}\text{C}$	5s	45
	60 $^{\circ}\text{C}$	30s	

反应体积选择 30 μL ，开始运行。各实验室可根据所用机型进行设置反应程序。

六、结果分析

以 ABI7500, 软件版本 2.4 为例:

1. 分析设定

- 1.1 推荐阈值 (Threshold=0.2), 亦可采用自动阈值。如需手动调整, 阈值线要高于阴性对照或者基线噪音, 通常设置在样本重复性较好的指数增长期的后期, 不同通道需要设置各自独立、合适的阈值线。
- 1.2 基线通常采用自动基线。如需手动调整, 基线起始循环数选择在指数增长期之前, 起点需避开起始荧光采集的波动区, 终点选择在最早出现指数扩增样本的 Ct 值的前 1~2 个循环。

2. 结果判定

2.1 PC、NTC、PCS、NCS 结果判定参考如表 7。

表 7 质控结果分析

质控样品	FAM 信号	VIC 信号
PC	Ct<35, 且有明显的扩增曲线	Ct<37, 且有明显的扩增曲线
NTC	Ct≥40, 或无明显扩增曲线	Ct<37, 且有明显的扩增曲线
PCS	Ct<35, 且有明显的扩增曲线	Ct<37, 且有明显的扩增曲线
NCS	Ct≥40, 或无明显扩增曲线	Ct<37, 且有明显的扩增曲线

注: ①快速模式实验流程无需检测 PCS、NCS, 即该模式下无需进行 PCS、NCS 分析。

②质控结果判定标准, 可依据各实验室的检测限验证结果考虑。

2.2 待测样品检测结果判断, 参考表 8。

表 8 待测样品结果分析

FAM 信号	VIC 信号	结果判定
Ct<40 且有明显扩增曲线	Ct<40, 且有明显的扩增曲线	阳性
	Ct≥40, 或无明显扩增曲线	阳性, 有抑制
Ct≥40, 或无明显扩增曲线	Ct<40, 且有明显的扩增曲线	阴性
	Ct≥40, 或无明显的扩增曲线	无法判断, 有抑制

注: 若出现有抑制的情况, 需重新测试或对样品进行合适处理消除抑制因子。

七、注意事项

1. 本试剂盒仅供科研使用，不用于临床诊断。
2. 本试剂盒需严格按照说明书操作步骤使用，以保证最佳的检测结果。
3. 提取阳性对照 PCS，可以加入 10 μ L PC+190 μ L 样品空白buffer（或者 1 \times PBS）作为样本提取，或根据实验室情况调整。
4. 若在提取时加入 IC，可以在待测样品中加入 10 μ L IC，50 μ L 洗脱，10 μ L 上样。
5. IC 通道荧光可以根据实验室情况选择是否收集及后期数据处理。
6. 由“核酸释放剂”获得样本 DNA 样品，PCR 扩增体积应小于2 μ L。
7. 试剂盒组分建议在低温下融化使用。
8. 建议使用带滤芯吸头。

八、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。