

【产品名称】

通用名称：结核分枝杆菌核酸检测试剂盒（PCR-荧光法）

【包装规格】 20 人份/盒。**【预期用途】**

本产品用于定性检测人痰液中的结核分枝杆菌核酸。

【检验原理】

本试剂盒采用一对结核杆菌特异性引物和一条结核杆菌特异性荧光探针，配以 PCR 反应液、耐热 DNA 聚合酶（Taq 酶）、四种核苷酸单体（dNTPs）等成分，用 PCR 体外扩增法，通过荧光信号的变化，检测结核杆菌 DNA。

【主要组成成份】

试剂名称	规格	组成成份	数量	用途
DNA 提取液	500 μ L/管	去污剂和 Tris 盐酸缓冲液	2 管	样本处理
PCR 反应管(未贴标签管)	1 人份/管	TB 特异引物探针和 Taq 酶	20 管	核酸扩增
阴性质控品	250 μ L/管	无菌生理盐水	1 管	核酸扩增
TB 临界阳性质控品	50 μ L/管	TB 减毒菌株稀释液	1 管	核酸扩增
TB 强阳性质控品	50 μ L/管	TB 减毒菌株稀释液	1 管	核酸扩增

【储存条件及有效期】 -20℃保存，有效期 6 个月。避免反复冻融。试剂盒生产日期和有效日期见产品标签。

【适用仪器】 DA-620 荧光检测仪，ABI Prism 7500，ABI Prism 7300，Roche LightCycler

【样本要求】

用无菌 5mL 玻璃管取受检者肺深部咳出痰液 1~3 毫升，密闭，即为标本。或直接抽取外周血 2mL(抗凝)。标本可立即用于测试，也可保存于-20℃待测，保存期为 6 个月。标本运送应采用 0℃冰壶。

【检验方法】**1. 标本及质控品的处理**

痰液中加入 4 倍体积的 4% NaOH，摇匀，室温下放置 30 分钟左右液化，取 0.5mL 至 1.5mL 离心管中，再加入 0.5mL 4%NaOH 室温放置 10 分钟后 15,000rpm 离心 5 分钟。去上清，沉淀加无菌生理盐水 1mL 打匀，15,000rpm 离心 5 分钟；再重复洗涤一次。（血液标本直接用淋巴细胞分离液分离沉淀白细胞）沉淀直接加 50 μ L DNA 提取液充分混匀，（提取液内含不溶于水的物质，取样时需用加样器充分混匀后吸取。如出现因吸头嘴部太细不能吸取或取样后堵塞吸头的现象，可先用洁净无污染的剪刀将吸头嘴部剪去一截。）沸水浴 10 分钟（误差不超过 1 分钟），转至 4℃静置 6~8 小时以保证充分裂解。10,000 rpm 离心 5 分钟，取上清液 2 μ L 做 PCR 反应。另取阴性质控品、阳性质控品各 50 μ L 加等量 DNA 提取液打匀，沸水浴 10 分钟后同上处理。

2. PCR 扩增及仪器操作：**2.1 PCR 扩增及 DA-620 仪器荧光检测操作**

取单管单人份 PCR 反应管若干，直接加入处理后样品或阴性质控品、阳性质控品 2 μ L，8,000rpm 离心数秒。将各反应管放入 PCR 仪，按下列条件扩增：93℃→2 分钟预变性，然后按 93℃ 45 秒→55℃ 120 秒，反应 10 个循环后置 33℃保温，迅速逐个将反应管放入荧光检测仪，读取并记录读数 A_0 。荧光激发波长为 487nm，检测波长为 525nm。最后按 93℃ 45 秒→55℃ 120 秒，共做 30 个循环后置 33℃保温。（使用 PE 9600，9700，2400 仪器循环参数为 93℃ 30 秒 →55℃60 秒，其它仪器循环参数为 93℃ 45 秒 → 55℃ 120 秒。）

PCR 反应后荧光检测，待各 PCR 管充分冷却至 33℃后，迅速逐个将扩增后的反应管放入荧光检测仪，读取并记录读数 A_1 。荧光激发波长为 487nm，检测波长为 525nm。

2.2 ABI Prism 7500，ABI Prism 7300，Roche LightCycler 操作

将各反应管放入 PCR 仪器的孔反应槽内，按对应顺序设置阴性质控品、阳性质控品以及未知标本，并设置样品名称、标记荧光基团种类和循环条件：

ABI Prism 7500、ABI Prism 7300 的循环条件：93℃→2 分钟预变性，然后按 93℃ 45 秒→55℃ 60 秒，先做 10 个循环，最后按 93℃ 30 秒→55℃ 45 秒，做 30 个循环。

2.3 Roche LightCycler 操作

将处理后的样品（或阴性质控品、阳性质控品）2 μ L 加入专用毛细管中 4,000rpm 离心 3 分钟，插入圆形卡盘倒置 20 秒钟后放入仪器中设置循环条件：93℃→2 分钟预变性，然后按 93℃ 5 秒→57℃ 45 秒，做 40 个循环，最后置 37℃延伸 1 秒。

所有设置全部完成后保存文件，最后运行程序。

3. 结果分析条件的设定

DA-620 的条件设置：计算： $A_x = A_1 - A_0$ 。将阴性质控品管的 A_x 称为 N，临界阳性质控品的 A_x 值称为 P1，强阳性质控品的 A_x 称为 P2。

ABI Prism 7500、ABI Prism 7300 的条件设置：反应结束后保存检测数据文件。根据分析后图像调节 baseline 的 start 值（2~4），stop 值（7~9）以及 Threshold 值，最后到 Reporter 窗口下记录仪器自动分析计算出的 Ct 值。

Roche LightCycler 的条件设置：反应结束后自动保存检测数据文件，调整荧光记数值(Fluorescence)为 F1/F2，点击 Quantification 读取结果。

4. 质量控制

阴性质控品：全部阴性

阳性质控品：全部阳性

DA-620 仪器：P2、P1、N 此 3 值应满足 $P2 > P1 > N$ ，则本次实验有效。否则，实验无效，应检查试剂、仪器、反应条件等方面的误差。

ABI Prism 7500、ABI Prism 7300、Roche LightCycler 仪器：阴性质控品 Ct 值 > 临界阳性质控标准品 Ct 值 > 强阳性质控标准品 Ct 值，则本次实验有效。

否则，实验无效，应检查试剂、仪器、反应条件等方面的误差。

【检验结果的解释】

DA-620 仪器：在实验有效的前提下，样品 $A_x > N + 0.6 \times (P1 - N)$ 判为阳性；如果 $N + 0.6 \times (P1 - N) \geq A_x \geq N + 0.4 \times (P1 - N)$ 则属于实验灰度区，需重复实验一次，若重复实验结果 A_x 值 $\geq N + 0.4 \times (P1 - N)$ 判为阳性，否则判为阴性；如果 A_x 值 $< N + 0.4 \times (P1 - N)$ 判为阴性。

ABI Prism 7500、ABI Prism 7300、Roche LightCycler 仪器：

阴性结果判定：

ABI Prism 7500、ABI Prism 7300 仪器：如果 Ct 值=30，则实验结果为阴性。

Roche LightCycler 仪器：如果 Ct 值=40，则实验结果为阴性。

阳性结果判定：

ABI Prism 7500、ABI Prism 7300 仪器：如果 Ct 值<30，则实验结果为阳性。

Roche LightCycler：如果 Ct 值< 40，则实验结果为阳性。

【注意事项】

1. PCR 仪应尽可能采用孔间均一性良好的仪器，如 PE9600 等，以提高定量准确度。不宜采用直接接触式水浴 PCR 仪，以免管壁外沾染石蜡油，影响荧光测定。
2. DNA 提取液、PCR 反应液和冻存的菌液标本使用前，需充分融化后混匀。
3. 反应管中加入 DNA 模板后，应尽快完成荧光测定，开始 PCR 反应。
4. 所有反应管在前后两次测定荧光值时，应尽可能以同一方向放入荧光仪的样品槽。PCR 反应后的各管一定要等到完全冷却到室温时，再进行测定。如果前后两次测定时室温变化较大 ($>5^{\circ}\text{C}$) 或室温低于 0°C ，则应在反应前后的两次测定中，将荧光仪和 PCR 反应管一齐放入恒温箱 ($4^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$)，使温度充分平衡，再测定荧光。
5. 不再使用的标本和反应管，应集中密封，定时高压灭菌处理。
6. 为避免污染，提高 PCR 准确性，应遵循以下 PCR 操作规则：
6. 1 PCR 操作各阶段（标本处理，PCR 反应准备和加样，PCR 反应和测定）应在不同的实验室中进行，每个阶段使用专用的仪器和设备。
6. 2 使用自卸滴头移液或堵塞性滴头。
6. 3 在试剂和标本处理阶段，使用负压超净工作台。
6. 4 需由具有专门经验和经过培训的人员进行操作，操作员应穿工作服，戴一次性手套并经常替换。
6. 5 每次检测应设置阴性、临界阳性、阳性质控品。
6. 6 使用一次性器具，工作台和加样器应经常用 10%次氯酸或 70%酒精或紫外灯处理。

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州达安基因股份有限公司

住所：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

联系方式：邮政编码：510665

电话：400 000 0340 020-32290789

传真：020-32068820

网址：<http://www.daangene.com>

售后服务单位名称：广州达安基因股份有限公司

联系方式：邮政编码：510665

电话：400 000 0340 020-32290789

传真：020-32068820

网址：<http://www.daangene.com>

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房。

生产许可证编号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号

【说明书核准及修改日期