

## 幽门螺旋杆菌（HP）核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

### 【产品名称】

通用名称：幽门螺旋杆菌（HP）核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

Name : Helicobacter Pylori Detection Kit (Real-Time PCR Method)

【包装规格】25T/盒、50T/盒

### 【预期用途】

本试剂盒适用于检测水样粪便，疑似污染的水、食物等样本中的幽门螺旋杆菌，用于幽门螺旋杆菌感染的辅助诊断。

### 【检验原理】

本试剂盒采用 TaqMan 探针法实时荧光 PCR 技术，设计一对幽门螺旋杆菌特异性引物，结合一条特异性探针，用荧光 PCR 技术对幽门螺旋杆菌的 DNA 进行体外扩增检测，用于临床上对可疑感染者的病原学诊断。

### 【试剂组成】

包装规格	25T/盒	50T/盒
HP 反应液	500 $\mu$ L $\times$ 1 管	500 $\mu$ L $\times$ 2 管
酶液	25 $\mu$ L $\times$ 1 管	50 $\mu$ L $\times$ 1 管
HP 阳性质控品	50 $\mu$ L $\times$ 1 管	50 $\mu$ L $\times$ 1 管
阴性质控品	250 $\mu$ L $\times$ 1 管	250 $\mu$ L $\times$ 1 管
HP 阳性标准品 (1.64 $\times$ 10 <sup>7</sup> copies/mL)	50 $\mu$ L $\times$ 1 管	50 $\mu$ L $\times$ 1 管
HP 阳性标准品 (1.64 $\times$ 10 <sup>6</sup> copies/mL)	50 $\mu$ L $\times$ 1 管	50 $\mu$ L $\times$ 1 管
HP 阳性标准品 (1.64 $\times$ 10 <sup>5</sup> copies/mL)	50 $\mu$ L $\times$ 1 管	50 $\mu$ L $\times$ 1 管
HP 阳性标准品 (1.64 $\times$ 10 <sup>4</sup> copies/mL)	50 $\mu$ L $\times$ 1 管	50 $\mu$ L $\times$ 1 管

说明：不同批号的试剂盒组分不可交互使用。

### 【储存条件及有效期】

-20 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C，避光保存、运输、反复冻融不超过 5 次，有效期 12 个月。

### 【适用仪器】

ABI、安捷伦 MX3000P/3005P、LightCycler、Bio-Rad、Eppendorf 等系列荧光定量 PCR 检测仪。

### 【标本采集】

水样便取 0.5~1mL；疑似污染的食物取 1g

### 【保存和运输】

上述标本短期内可保存于-20 $^{\circ}$ C，长期保存可置-70 $^{\circ}$ C，但不能超过 6 个月，标本运送应采用 2~8 $^{\circ}$ C 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

水样便 13000rpm 离心 2min，去尽上清；疑似污染的食物用手剪剪碎混匀后取 0.5g 于研磨器中研磨，加入 1.5mL 生理盐水后继续研磨，待匀浆后转至 1.5mL 灭菌离心管中，8000rpm 离心 2min，取上清液 100 $\mu$ L 于 1.5mL 灭菌离心管中；疑似污染的水直接取 100 $\mu$ L 转入 1.5mL 灭菌离心管中

##### 1.2 核酸提取

推荐采用上海将来实业股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂(磁珠法或离心柱法)进行核酸提取，请按照试剂说明书进行操作。

#### 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；反应管数每满 10 份，多配制 1 份)，每测试反应体系配制如下表：

试剂	HP 反应液	酶液
用量（样本数为 N）	20 $\mu$ L	1 $\mu$ L

将混合好的测试反应液分装到 PCR 反应管中，21 $\mu$ L/管。

#### 3. 加样（样本处理区）

将步骤 1 提取的核酸、阳性质控品、阴性质控品各取 4 $\mu$ L，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 仪反应槽内；

4.2 设置好通道、样品信息，反应体系设置为 25 $\mu$ L；

荧光通道选择：检测通道（Reporter Dye）FAM，淬灭通道（Quencher Dye）NONE，ABI 系列仪器请勿选择 ROX 参比荧光，选择 None 即可。

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 $^{\circ}$ C	10min	否
2	40 cycles	94 $^{\circ}$ C	15sec	否
		55 $^{\circ}$ C	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 质控标准

5.2.1 阴性质控品：用作阴性质控。FAM 通道无 S 型曲线，在 Reports 界面 Ct 一栏显示 Undet.；

5.2.2 阳性质控品：扩增曲线有明显指数生长期，且 Ct 值 $\leq$ 32；以上条件应同时满足，否则实验视为无效。

5.2.3 阳性标准品：用作标准曲线的绘制。FAM 通道有 S 型曲线，标准品线性相关系数 $|R(r)|\geq 0.98$ 。

以上条件必须在同一次实验中全部满足，否则本次实验结果无效。

### 6. 检验结果的解释

在满足质量控制的条件下，待检样本检测结果 Ct 值为“Undet”或核酸含量显示 $<1\times 10^3$ copies/mL，报告“低于试剂盒最低检测限( $1\times 10^3$  copies/mL)”；核酸含量在  $1\times 10^3$ copies/mL~ $1\times 10^8$ copies/mL 之间的样本，直接报告测定数值；核酸含量高于  $1\times 10^8$ copies/mL 的样本，建议用 1 $\times$ TE 稀释后重新测定，结果根据稀释倍数进行校准，报告校准后的值，并注明“可报告浓度”。

### 7. 检测方法的局限性

1. 样本检测结果与样本收集、处理、运送以及保存质量有关；
2. 样本提取过程中没有控制好交叉污染，会出现假阳性结果；
3. 阳性对照、扩增产物泄漏，会导致假阳性结果；
4. 病原体在流行过程中基因突变、重组，会导致假阴性结果；
5. 不同的提取方法存在提取效率差异，会导致假阴性结果；
6. 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；
7. 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。

#### 【注意事项】

1. 所有操作严格按照说明书进行；
2. 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；
3. 反应液应避免光保存；
4. 反应中尽量避免气泡存在，管盖需盖紧；
5. 使用一次性吸头、一次性手套和各区专用工作服；
6. 样本处理、试剂配制、加样需在不同区进行，以免交叉污染；
7. 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；
8. 试剂盒里所有物品应视为污染物对待，并按照《微生物生物医学实验室生物安全通则》进行处理。