

GNM细菌DNA 检测试剂盒

说明书

货 号:

HCD0304-050 (50T)

一、试剂盒简介

本试剂盒乃是采用 Q-PCR 探针法对细菌 16S rDNA 进行扩增的试剂盒，借助扩增曲线所对应的 CT 值来判定细菌的污染状况。其可定性检测细胞、细胞制品、疫苗等产品中是否存在细菌污染。该试剂盒依据中国药典 qPCR 方法检测的相关要求予以验证，检测限不超过 10 CFU/反应。

本试剂盒利用荧光探针法 qPCR 技术，可定性检测样品中是否存在细菌 DNA。现今已有超过 10,000 种细菌的 16SrDNA 序列被报道，本试剂盒能够覆盖约 92% 以上已报道的细菌物种，具有良好的广谱性和强特异性。

对于那些要求快速检测、难以培养、生化反应不明显以及传统表型方法无法鉴定的细菌，运用本试剂盒来鉴定未知细菌的种类尤为便捷。

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	HCD0304-050 (50T)	保存
细菌阳性质控品 PC	50 μL	-20±5°C
2×BqPCR reaction buffer	800 μL	-20±5°C
细菌 primer&probe mix	200 μL	-20±5°C, 避光
DNA 稀释液	1.5 mL×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。

六、检测方法

(一) 模板 DNA 的提取 (样本处理区)

实验用的细菌基因组 DNA 可以通过传统的苯酚 / 氯仿抽提法取，也可用本公司的**真菌&细菌 DNA 提取纯化试剂盒 (磁珠法)**获得。

(二) qPCR 反应体系配置 (试剂准备区)

1. 根据所要检测的样品数量，计算所需反应孔数，一般每个样做 2 个重复孔。
2. 按以下组份进行 qPCR 体系配置：

qPCR 反应体系

组分	单孔体积
2×BqPCR reaction buffer	15μL
细菌 primer&probe mix	4μL
DNA 稀释液	1μL
样本 DNA (PCS/PC /NCS /NTC /待测样品)	10μL

(三) 加样 (样本处理区)

1. 在分装好 PCR 反应液的 PCR 反应管中分别加入 10μL 处理好的样本 DNA、NCS、NTC、PCS、PC。
2. 贴好封板膜，稍做离心。
3. 转移到检测区，放入相应的荧光 PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

(四) PCR 扩增 (检测区)

荧光 PCR 仪上，设置如下程序，反应体积选择 30μL。

qPCR 反应程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95°C	10min	1
	95°C	15s	
循环	55°C	30s	35
	72°C	1min	

注：各实验室可根据所用机型进行设置反应程序。

(五) 结果分析

1. NTC、NCS、PC、PCS 检测结果应为：

质控结果分析

质控样品	CT 值
NTC	2 复孔 $Ct \geq 30.00$ 或扩增曲线无明显起峰
NCS	2 复孔 $Ct \geq 30.00$ 或扩增曲线无明显起峰
PC	2 复孔 $Ct < 24.00$ 且有效的“S”型扩增
PCS	2 复孔 $Ct < 27.00$ 且有效的“S”型扩增

*质控标准应基于实验室验证数据, 可从满足检测限要求考虑。

2. 待测样品检测结果判定:

待测样品检测结果分析

待测样品	质控样品	结果判断
2 复孔有 1 孔以上 $Ct < 27.00$ 且有效的“S”型扩增	符合要求	检出
	$Ct PCS \geq 27.00$	实验操作有误
2 复孔 $Ct \geq 27.00$ 或扩增曲线 无明显起峰	符合要求	未检出
	$Ct PCS \geq 27.00$	无法判断, 需重测

*倘若阴性质控的 Ct 值小于 27.00, 且其 Ct 值比 20-100 CFU 菌株超出 2 个循环及以上, 那么就可认定阴性质控符合要求。

*当阴性质控符合要求时, 倘若待测样品的 Ct 值小于 27.00, 同时其 Ct 值比 20-100 CFU 菌株超出 2 个循环及以上, 那么也可判定为未检出。

*要是遇到特殊样品或者其他异常现象, 导致结果难以判定时, 可与金诺美取得联系, 咨询具体的解决方案。

七、注意事项

1. 本实验所使用的试剂极易污染, 实验尽可能在超净工作台中进行。
2. 实验室应按试剂准备区、样本处理区、反应液配置区、扩增检测分析区分隔使用。工作流程: 操作过程应穿无细菌污染工作服、帽、鞋、手套等穿戴齐全, 各区物品均为专用, 不得交叉使用, 避免污染;
3. 实验过程中若出现标本及试剂污染工作台及移液器, 应及时用 10%次氯酸钠或核酸清除剂处理。实验结束后应立即清洁工作台, 并定期对工作台及各种实验用品进行消毒;

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。