

# 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℃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℃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℃
2×BqPCR reaction buffer	800 μL	-20±5℃
细菌 primer&probe mix	200 μL	-20±5℃, 避光
DNA 稀释液	1.5 mL×2	-20±5℃

## 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。

\*当阳性质控符合要求时，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。