

GNM 细菌 DNA 检测试剂盒

(qPCR-荧光探针法)

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 16S rDNA 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。

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. 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) ×20μL (2 为损失孔数)

按以下组份进行 qPCR 体系配制：

表 1 反应混合液配制

组分	单孔体积
2×BqPCR reaction buffer	15μL
细菌 primer&probe mix	4μL
DNA 稀释液	1μL
总体积	20μL

(三) 加样（样本处理区）

1. 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 10μL PC+90μL 样品空白 buffer（或者 1×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。

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)

以 ABI7500 为例:

1. 新建实验, 选择“Absolute Quantification”;
2. 输入实验名称, 选择 Quantitation-Standard Curve, TaqMan reagents 和 Standard 模式;
3. 选择报告荧光基团, 细菌通道荧光基团为 FAM, 猝灭基团为 None; 参比荧光为 ROX;
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°C	10min	1
循环	95°C	15s	35
	55°C	30s	
	72°C	1min (采集荧光)	
通道选择: FAM			

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。

(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。

