

细菌 DNA 检测试剂盒

(PCR-荧光探针法)

说明书

货号：1504632

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点！

版本：A/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

MicroSHENTEK® 细菌 DNA 检测试剂盒（PCR-荧光探针法）与 MicroSHENTEK® 真菌&细菌 DNA 提取纯化试剂盒（磁珠法）配套使用，定性检测细胞、细胞制品、疫苗等产品中是否有细菌污染。试剂盒参照中国药典 qPCR 方法检测相关要求进行了验证，检测限为不大于 35 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，可覆盖约 92% 的已知细菌物种，匹配近 6 万种（或亚种）细菌 DNA 序列；通过多种细菌、非细菌和常见工程细胞物种 DNA 检测，广谱性好，特异性强。

该试剂盒仅供研究使用，不可用于诊断。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	规格	储存条件
Bac qPCR Reaction Buffer	NNB019	220 μ L \times 2 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下，避光
Bac Primer&Probe MIX	NNC098	50 μ L \times 2 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下，避光
Bac 阳性质控（PC）	NNA047	50 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL \times 2 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下

■ 规格

50 Reactions。

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型（包括但不限于以下机型，使用前需用户验证检测限灵敏度）

- SHENTEK-96S
- Roche LightCycler 480 II

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 或 2.0 mL 无菌低吸附离心管
- 八联管及管盖
- 1000 μ L，200 μ L，100 μ L，10 μ L 无菌低吸附带滤芯枪头

- 75 %酒精
- 医疗用一次性利器盒
- 核酸清除剂，联系本公司订购

■ 相关设备

- 单人桌面无菌超净工作台（SSD-1）
- 迷你离心机
- 漩涡振荡器
- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μL ，200 μL ，100 μL ，10 μL 移液枪

■ 实验操作流程

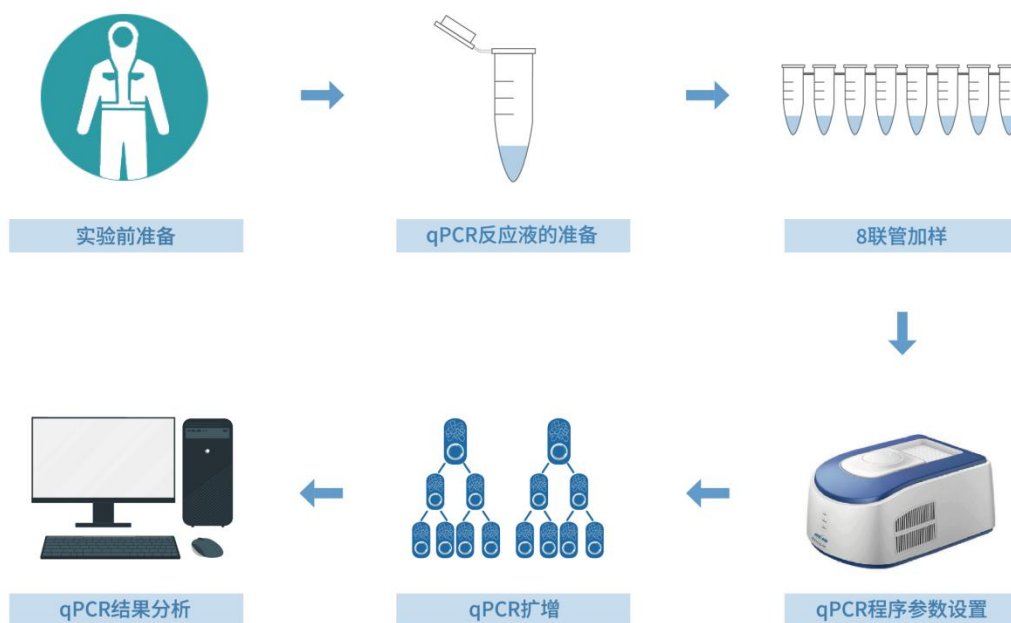


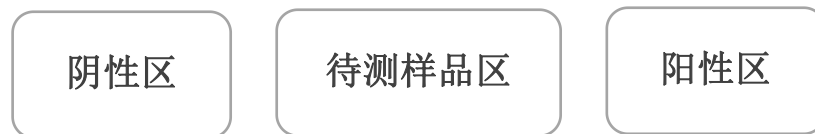
图 1 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

（一）实验前准备：

1. 穿戴适当的工作及防护服，至少穿戴无 DNA 污染的工作服、一次性反穿衣、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子和医用口罩。

2. 工作区及环境采取适当地消毒，去除残留核酸。至少工作台面、移液枪、枪头、八联管及管盖、离心管及离心管架紫外照射时长**不少于1小时**，使用核酸清除剂、75%酒精全面擦拭消毒。
3. 将试剂盒从冰箱-18℃以下区域转移至2-8℃区域融化，涡旋振荡混匀并瞬时离心。
4. 参考《MicroSHENTEK®真菌&细菌 DNA 提取纯化试剂盒（磁珠法）说明书》要求进行分区：分为阴性区、待测样品区、阳性区。
分别在各区域单人桌面无菌超净工作台（SSD-1）中操作。



阴性区：试剂配制区域&NCS、NTC 阴性质控加样区域；

待测样品区：待测样品加样区域；

阳性区：PCS、PC 阳性质控加样区域。

（二）qPCR 反应液准备：

1. 根据所要检测样品的数量，计算所需反应孔数，一般做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个阴性对照样品 NCS + 1个阳性对照样品 PCS + N个待测样品) × 2
2. 根据反应孔数计算所需的 qPCR MIX 总量：
qPCR MIX 总量 = (反应孔数+2) × 10 μL (含有2孔的损失量)
3. 将各试剂根据表2所示准备 qPCR MIX：

表 2. qPCR MIX 配制表

组分	单孔用量
Bac qPCR Reaction Buffer	8 μL
Bac Primer&Probe MIX	2 μL
总体积	10 μL

* qPCR MIX 配制应在阴性区无菌超净工作台中操作。

二、操作步骤

（一）加样

1. 将所有溶液振荡混匀后根据表 3 所示加样，排版方式可参考表 4：

表 3. 各反应孔加样示例

各样品	加样量
阳性质控 PC	10 μ L qPCR MIX + 20 μ L 稀释 10^{-6} 阳性质控
无模板对照 NTC	10 μ L qPCR MIX + 20 μ L DNA 稀释液
阴性对照样品 NCS	10 μ L qPCR MIX + 20 μ L NCS 纯化液
阳性对照样品 PCS	10 μ L qPCR MIX + 20 μ L PCS 纯化液
待测样品	10 μ L qPCR MIX + 20 μ L 待测样品纯化液

*若用户样品经过完整的提取和检测过程，只需随带 NCS、PCS 阴阳性对照样品即可。

表 4. 检测孔排版示例

NTC	NCS				S1	S1				PCS	PC	A
NTC	NCS				S2	S2				PCS	PC	B
					S3	S3						C
					S4	S4						D
					S5	S5						E
					S6	S6						F
					S7	S7						G
					S8	S8						H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

✧ 该示例表示的是检测 1 个阳性质控 PC、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性对照样品 NCS、1 个阳性对照样品 PCS、8 个待测样品。每个检测做 2 个重复孔。

✧ 实际检测时可根据样品多少，参照此示例进行排版加样。

***严格注意操作顺序：**应当依次在阴性区完成 NTC 和 NCS 加样及封闭，待测样品区完成待测样品加样及封闭，阳性区完成 PCS 加样及封闭，最后完成稀释 10^{-6} PC 加样及封闭。（**注意：**阳性质控 PC 需要按 10 倍梯度稀释 10^6 之后加样，为避免实验污染，必须在实验最后一步进行稀释操作）

（二）程序参数设置

将八联管用管盖封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心 10 秒后放入 qPCR 仪，接着进行 qPCR 程序设置：

- SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. 点击“实验向导”。
2. “孔板编辑”页面中选择步骤 1：选择反应孔。
3. 选择步骤 2：选择项目中的“**Micro-Fun&Bac**”程序。
4. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。

- 其他荧光定量 qPCR 系统推荐程序设置如下：

1. 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。
2. 创建新检测探针，命名为“细菌检测”，选择报告荧光基团为 FAM。
3. 设置三步法反应程序：

95 °C 预变性 10 分钟；

95 °C 15 秒，55 °C 30 秒，72 °C 1 分钟（读取荧光），45 个循环；


反应体积 30 μ L。

- ✚ 若真菌&细菌使用同一台荧光定量 qPCR 系统检测，则需按照真菌检测程序增加 25°C UNG 酶作用 10 分钟和采用 FAM 和 VIC 双通道检测。

三、结果计算与判断

（一）结果计算

- 以 SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。


1. “孔板编辑”页面中步骤 3：定义反应孔，将 NTC 孔的样品类型设置为无模板对照，PC 孔、PCS 孔设置为阳性对照，NCS 孔设置为阴性对照，待测样品孔设置为待测样品。
2. 在“实验分析”页面点击 ，在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性对照样品 NCS、阳性对照样品 PCS、阳性质控 PC、待测样品的检测值。

- 以 Roche LightCycler 480 II、软件版本 1.5 为例。

1. 在 Subset Editor 的左下方点击“+”选项，然后选择相对应上样孔，确定后点击右下方的“Apply”选项保存。
2. 在 Sample Editor 的 Sample Name 一栏中命名相对应上样孔的名称

NTC、NCS、S、PCS、PC。

3. 在 Analysis 中选择 Abs Quant/Fit Points 分析类型，点击“√”选项进入界面，在 Noise Band 界面下方选择 Noiseband(Fluoresc)，通过手动改变 Noise Band 使阴阳性样品区分（此时 Threshold 将与 Noise Band 保持一致），然后点击左下方“Calculate”选项，进行 Ct 值读取。

 上述示例结果分析的参数设置仅供参考，具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定。

（二）结果判定

1. PC、NTC、NCS、PCS 检测结果应为：

表 5. 质控结果分析

质控样品	FAM 信号
NTC	2 复孔 Ct \geq 39.00 或扩增曲线无明显起峰
NCS	2 复孔 Ct \geq 39.00 或扩增曲线无明显起峰
PC	2 复孔 Ct $<$ 35.00 且有效的“S”型扩增
PCS	2 复孔 Ct $<$ 39.00 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：

表 6. 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 $<$ 39.00 且有效的“S”型扩增	符合要求	检出
	Ct _{PCS} \geq 39.00	实验操作有误
2 复孔 Ct \geq 39.00 或扩增曲线无明显起峰	符合要求	未检出
	Ct _{PCS} \geq 39.00	无法判断，需重测

*若阴性质控 Ct 值 $<$ 39.00 但 Ct 值大于 50-100 CFU 菌株 2 个循环及以上，则可判定阴性质控符合要求。

*阴阳性质控符合要求时，若待测样品 Ct 值 $<$ 39.00 但 Ct 值大于 50-100 CFU 菌株 2 个循环及以上，也可判定为未检出。

*如遇特殊样品或其他异常现象，结果难以判定，可联系湖州申科，咨询具体解

决方案。

生效日期：2024 年 02 月 06 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话：400-878-2189