



版本号：TRS0304-V2

细菌 DNA 检测试剂盒 (qPCR-荧光探针法) 说明书

货 号：

TRS0304-050 (50T)

TRS0304-025S(25T)



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 50~100 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°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	TRS0304-050 (50T)	TRS0304-025S (25T)	保存
细菌阳性质控品 PC	50 μL	25 μL	-20±5°C
2×BqPCR reaction buffer	800 μL	400 μL	-20±5°C
细菌 primer&probe mix	200 μL	100 μL	-20±5°C，避光
DNA 稀释液	1.5 mL×2	1.5 mL	-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

实验流程

1. 待测样本的 DNA 准备

1.1 建议配套使用本公司“真菌&细菌 DNA 提取纯化试剂盒(磁珠法)”，提取样本 DNA。

1.2 将试剂盒放置 2~8℃冰箱或冰上融化，涡旋混匀，瞬时离心。

2. qPCR 反应体系的准备

2.1 根据所要检测的样本数量，计算所需反应孔数，一般每个样本做 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

2.2 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。

$$\text{反应混合液总量} = (\text{反应孔数} + 2) \times 20 \quad (2 \text{ 为损失孔数})$$

按以下方案配置反应混合液。

表 1 反应混合液配置

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

3. 加样

充分旋涡混匀反应混合液，向每个反应孔加入 20 μL 反应混合液及 10 μL 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	20 μL 反应混合液+10 μL 阳性质控	30 μL
无模板对照 NTC	20 μL 反应混合液+10 μL DNA 稀释液	30 μL
提取阳性对照 PCS	20 μL 反应混合液+10 μL PCS 纯化液	30 μL
提取阴性对照 NCS	20 μL 反应混合液+10 μL NCS 纯化液	30 μL
待测样品	20 μL 反应混合液+10 μL 待测样品纯化液	30 μL

注：①PCS 纯化液可使用 10 μ L PC+90 μ L 样品空白 buffer（或者 1 \times 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。

4. qPCR 程序设置

以 ABI7500 为例：

4.1 新建实验，选择“Absolute Quantification”；

4.2 输入实验名称，选择 Quantitation-Standard Curve，TaqMan reagents 和 Standard 模式；

4.3 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；

4.4 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	荧光采集
预变性	95 $^{\circ}$ C	10min	1	
	95 $^{\circ}$ C	15s		
循环	55 $^{\circ}$ C	30s	35	
	72 $^{\circ}$ C	1min		采集荧光

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。

结果分析

以 ABI7500, 软件版本 2.4 为例:

1. 分析设定

- 1.1 推荐阈值 (Threshold=0.2), 亦可采用自动阈值。如需手动调整, 阈值线要高于阴性对照或者基线噪音, 通常设置在样本重复性较好的指数增长期的后期, 不同通道需要设置各自独立、合适的阈值线。
- 1.2 基线通常采用自动基线。如需手动调整, 基线起始循环数选择在指数增长期之前, 起点需避开起始荧光采集的波动区, 终点选择在最早出现指数扩增样本的 Ct 值的前 1~2 个循环。

2. 结果判定

2.1 PC、NTC、PCS、NCS 结果判定参考如表 7。

表 4 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

注: 质控结果判定标准, 可依据各实验室的检测限验证结果考虑。

2.2 待测样品检测结果判断, 参考表 8。

表 5 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, 可与通用生物取得联系, 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。

