MicroSHENTEK®

细菌 DNA 检测试剂盒

（PCR-荧光探针法）

说明书

货号：1504632

版本：测试版

仅供研究用，不可用于临床诊断

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验证，检测限为 100 CFU。

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；经过多种细菌、非细菌和常见工程细胞物种 DNA 检测，广谱性好，特异性强。

■ 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	NNB014	220 µL×2 管	-18℃及以下，避光
Bac Primer&Probe MIX	NNC081	40 µL×2 管	-18℃及以下，避光
Bac 阳性质控（PC）	NNA047	50 µL×1 管	-18℃及以下
DNA 稀释液	NND001	1.5 ml×2 管	-18℃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，使用前需验证检测灵敏度）

- SHENTEK-96S
- 7500 Real-Time PCR System
- 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 μL，100 μL，10 μL 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

■ 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，100 μL，10 μL 移液枪

操作过程

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：未知样品加样区域；

阳性区：PCS、PC 阳性质控加样区域。

❖ 实验前的准备

1．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。

❖ qPCR 反应液的准备

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 MIX 总量：

MIX =（反应孔数+2）× 10μL（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

组份	单孔用量
Bac qPCR Reaction Buffer	8.5 μL
Bac Primer&Probe MIX	1.5 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。

❖ 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

反应孔	加样示例
阳性质控 PC	10 μL qPCR MIX + 20 μL 阳性质控
无模板对照 NTC	10 μL qPCR MIX + 20 μL DNA 稀释液
阴性对照样品 NCS	10 μL qPCR MIX + 20 μL NCS 纯化液
阳性对照样品 PCS	10 μL qPCR MIX + 20 μL PCS 纯化液
待测样品	10 μL qPCR MIX + 20 μL 待测样品纯化液

* 按照样品类型在不同无菌超净工作台中进行加样，并注意加样顺序。

* 加样完成后体积为 30 μL /孔。

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。

2. 将八联管加管盖封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心 10 s 后放入 qPCR 仪。

***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 PC 和 PCS 加样及封闭。

***待 NTC、NCS、待测样品、PCS 样品加样封闭后，再将 PC 在阳性区按照 10 倍稀释梯度稀释 10^5 倍后加样封闭。**

❖ **qPCR 程序参数设置**

✧ **以 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-Bac”**程序。

4. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。

✧ **其他定量 PCR 系统**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，猝灭荧光基团为 none，检测参比荧光为 ROX（可选）。

3. 设置三步法反应程序：**95℃预变性 10 min；95℃ 15 s，65℃ 30 s，72℃ 1 min （读取荧光），45 个循环；**反应体积 30 μL。

❖ **qPCR 结果分析**

✧ 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、阴性质控 NCS、待测样品的检测值。

✧ 以 **7500 Real-Time PCR System**、软件版本 1.4 为例。

1．在 Results 的 Amplification Plot 面板中，将 Threshold 设置为 0.02，点击 Analyze，此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。

2．在 Results 的 Plate 面板中，将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC，将阴性质控 NCS 孔、待测样品孔、PCS 孔的 Task 一栏设置为 Unknown，并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S、PCS，之后点击 。

3．在 Results 的 Report 面板中，Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品、PCS 的检测值。

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，一般也可由仪器自动判读。

❖ 判定标准

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≥39 或扩增曲线无明显起峰
NCS	2 复孔 Ct≥39 或扩增曲线无明显起峰
PC	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增
PCS	2 复孔 Ct<39 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 且有效的“S”型扩增	符合要求	阳性
	Ct_{PCS} ≥39	实验操作有误
2 复孔 Ct≥39 或扩增曲线无明显起峰	符合要求	阴性
	Ct_{PCS} ≥39	阴阳性无法判断，需重测

*若阴性质控 Ct_{NCS}＜39 但与 100 CFU 验证菌株 Ct 值相差 2 个循环及以上，也可进行有效定性判断。

*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。

修订日期：2023 年 05 月 20 日

生效日期：2023 年 05 月 23 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：0572-2165910