



# 细菌qPCR检测 试剂盒(探针法)

—— 使用说明书 ——

Version 1.2



武汉珈创生物技术股份有限公司

地址：湖北省武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号光谷国际生物医药企业加速器 3.1 期 4 栋 1 层、2 层、3 层

微信公众号

[www.canvestbio.com](http://www.canvestbio.com)

[bd@canvestbio.com](mailto:bd@canvestbio.com)

400 - 027 0021

武汉珈创生物技术股份有限公司

## 细菌qPCR检测试剂盒(探针法)

Cat #JCBA50D

### 【试剂盒简介】

CANVEST® 细菌 qPCR 检测试剂盒采用了荧光探针 qPCR 技术,用于定性检测细胞、细胞及基因治疗产品以及其他生物制品中是否有细菌的污染。

本试剂盒中的引物探针可以对多种细菌进行特异性检测,与真菌、支原体、昆虫、人类及动物细胞(猪源细胞除外)不存在交叉反应。本试剂盒与《CANVEST® 细菌核酸提取试剂盒》配套使用对样本进行提取和检测,参照中国药典 qPCR 方法检测相关要求验证,检测限为 100 CFU/mL。

试剂盒中加入了内部控制系统,内部控制对照(IC)可在 PCR 扩增反应阶段加入,以判断待检样本对扩增反应是否存在抑制;也可在样本提取阶段加入,作为实验整体对照,同时监测提取得率以及样本中可能存在的 PCR 抑制情况。

### 【试剂盒组分】

表 1 试剂盒组分

组份	装量(50 Tests)	储存条件
细菌 qPCR Mix 反应液	360 $\mu$ Lx3 管	-20°C及以下,避光
PCR 内部控制对照(IC)	10 $\mu$ L	-20°C及以下
阳性对照(PC)	25 $\mu$ L	-20°C及以下
PCR 稀释液	500 $\mu$ Lx2 管	-20°C及以下

### 【规格】

50 Reactions

### 【运输储存方法】

干冰运输,试剂盒开封前,-20°C及以下保存,有效期半年。

初次使用时,建议将各组分分装,以减少反复冻融次数和降低污染风险。

### 【适用机型】

Bio-Rad: CFX 96、CFX Connect 等; Applied Biosystems: QuantStudio 1 Plus 等。

### 【实验流程】

#### 一、实验前准备

##### 1、实验操作分区

区域 1: qPCR 反应液准备和 NTC 加样区

区域 2: 待测样本和 NEC 加样区(同样本提取区)

区域 3: 阳性 PC 加样区

##### 2、环境控制

实验操作之前使用核酸清除剂、75% 酒精对操作台进行全方位擦拭消毒处理,并将所用设备耗材转移至相应的操作台中,紫外灭菌不少于 30min。

##### 3、试剂准备

(1) 将检测试剂从 -20°C 以下区域转移至 2~8°C 区域融化,所有试剂使用前请颠倒混匀并离心,其中细菌 qPCR Mix 反应液避免涡旋振荡。

(2) PCR 内部控制对照准备: 在区域 1 中向 PCR 内部控制对照(IC)管中加入 90 $\mu$ L PCR 稀释液,轻微涡旋振荡混匀后瞬时离心。

(3) PCR 阳性对照(PC)准备: 在区域 3 中向阳性对照(PC)管加入 225 $\mu$ L 的 PCR 稀释液,轻微涡旋振荡混匀后瞬时离心。

#### 二、样品检测

##### 1、样本准备

推荐使用《CANVEST® 细菌 DNA 提取试剂盒》进行样本提取。

## 2. qPCR 反应液准备

2.1 根据所要检测样本的数量,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 个阴性提取对照 NEC+ N 个待测样本) × 2

2.2 根据反应孔数计算所需的 Mix 总量:

推荐 Mix 总量 = (反应孔数 + 2) × 20μL (含有 2 孔的损失量)

2.3 将细菌 qPCR Mix 反应液、已稀释的 PCR 内部控制对照 (IC) 和阳性质控对照 (PC) 放置冰上融化。

## 3. 加样

3.1 若内部控制对照 (IC) 在 DNA 提取时已加入到样本中,按以下步骤进行加样:

将细菌 qPCR Mix 反应液混匀后取 20μL 于各反应孔中,按表 2 中示例分区进行加样, PCR 反应终体积为 25μL。加样后立即盖好 PCR 管盖,将 PCR 管在快速离心机上离心 30s,尽快上机检测。

表 2 加样示例

反应孔	各反应孔加样示例	操作区域
无模板对照 NTC	20μL qPCR Mix + 4μL PCR 稀释液 + 1μL IC	区域 1
阴性提取对照 NEC	20μL qPCR Mix + 5μL NEC 提取液	区域 2
待测样本	20μL qPCR Mix + 5μL 待测样本提取液	区域 2
阳性质控对照 PC	20μL qPCR Mix + 4μL PC + 1μL IC	区域 3

3.2 若内部控制对照 (IC) 未在 DNA 提取时加入到样本中,则按以下步骤进行加样:

(1) 根据计算的反应孔数,按表 3 配制 qPCR Mix。

表 3 qPCR Mix 配制表

组分	单孔用量
细菌 qPCR Mix 反应液	19μL
内部控制对照 (IC)	1μL
总体积	20μL

(2) 将 qPCR Mix 混匀后取 20μL 于各反应孔中,按表 4 中示例分区进行加样, PCR 反应终体积为 25μL。加样后立即盖好 PCR 管盖,将 PCR 管在快速离心机上离心 30s,尽快上机检测。

表 4 加样示例

反应孔	各反应孔加样示例	操作区域
无模板对照 NTC	20μL qPCR Mix + 5μL PCR 稀释液	区域 1
阴性提取对照 NEC	20μL qPCR Mix + 5μL NEC 提取液	区域 2
待测样本	20μL qPCR Mix + 5μL 待测样本提取液	区域 2
阳性质控对照 PC	20μL qPCR Mix + 5μL PC	区域 3

## 4. qPCR 程序设置

4.1 在荧光定量 PCR 仪上运行程序,荧光通道选择 All channels,反应体积 25μL。

本方案中细菌探针偶联 FAM 荧光基团,内部控制探针偶联 HEX 荧光基团,创建 FAM 和 HEX 双通道。

4.2 反应程序如下:

表 5 细菌 qPCR 反应程序

1 cycle	95°C for 5min
40 cycles	95°C for 15sec
	58°C for 25sec
	72°C for 20sec (Plate Read)

注: 本试剂盒不含 ROX 参比染料,在使用 ABI 等仪器进行分析时反应板的参比荧光应选“无”。

## 5. 结果判定

分析模式选用阈值线 (Single Threshold mode), FAM 通道的基线阈值设置为阳性对照 PC (FAM 通道) 最大荧光信号值的 1/10, HEX 通道的基线阈值设置为 NTC (HEX 通道) 荧光值的 1/10。读取待测样本、阴性提取对照 NEC、无模板对照 NTC、阳性对照 PC 的 CT 值。NEC、PC、NTC 的检测结果应为表 6 所示,细菌样本结果判定遵循表 7 原则:

表 6 质控结果分析

质控样本	细菌 FAM 通道	内控 HEX 通道
无模板对照 (NTC)	阴性 (无 Ct 读值或无正常扩增曲线)	阳性 (Ct<40, 有正常扩增曲线)
阴性提取对照 (NEC)	阴性 (无 Ct 读值或无正常扩增曲线)	阳性 (Ct<40, 有正常扩增曲线)
阳性对照 (PC)	阳性 (Ct<35, 有正常扩增曲线)	阳性 (Ct<40, 有正常扩增曲线)

表 7 细菌待测样本检测结果判定

细菌 FAM 通道	内控 HEX 通道	结果判定
阳性 (Ct<35, 有正常扩增曲线)	无关	细菌阳性
阴性 (无 Ct 读值或无正常扩增曲线)	阴性 (无 Ct 读值或无正常扩增曲线)	qPCR 抑制
阴性 (无 Ct 读值或无正常扩增曲线)	阳性 (Ct<40, 有正常扩增曲线且未出现荧光信号 RFU 强度较 NTC 组降低 50% 以上)	细菌阴性
边界值 (35 ≤ Ct 值 ≤ 40, 有正常扩增曲线)	阳性 (Ct<40, 有正常扩增曲线)	可能存在低污染细菌, 重复提取检测, 或加大提取量重复提取及 PCR 操作, 得到的 FAM 通道 Ct 值仍处于边界值, 则判定细菌阳性

(1) PCR 抑制可能是由样本基质引起的, 如果样本的 2 个重复中有一个的内控 IC 为阴性, 则重复 PCR; 如果样本的 2 个重复的内控 IC 均为阴性, 则需重新提取 DNA 并重复 PCR。

(2) 若内控对照在 PCR 反应时加入, 细菌阴性提取对照 NEC 中 (FAM: 无 Ct 读值) 内控对照的 Ct 值与无模板对照 NTC 中 Ct 值间隔应在 ±2 cycles 范围之内。若内控对照在样本提取前加入作为包括提取及 PCR 整个过程的对照时, 细菌阴性提取对照 NEC 中 (FAM: 无 Ct 读值) 内控对照的 Ct 值与无模板对照 NTC 中 Ct 值间隔应在 ±3 cycles 范围之内。

(3) 阴性提取对照 NEC 的 HEX 通道 RFU 荧光信号强度较无模板对照 NTC 相比有 ≥50% 的降低, 则表明提取有抑制, 需重测或对样本进行合适处理消除抑制因子。

## 【注意事项】

1. 使用本试剂盒前请仔细阅读本说明书, 实验应规范操作;
2. 为避免细菌 DNA 交叉污染, 整个检测实验必须在无菌和无细菌 DNA 的条件下操作;
3. 实验操作台 (保证无菌状态)、使用设备需提前清洁杀菌, 进入实验操作台的物品必需经清洁杀菌处理再放入;
4. 避免在打开的管口上方工作, 并避免快速移动产生空气流动带来的污染;
5. 严格分区, 注意操作顺序, 按照样品类型在不同无菌操作台中进行加样, 应当依次在阴性区完成 qPCR 反应液配制和 NTC 加样, 待测样品区完成 NEC 和待测样品加样, 阳性区完成阳性对照 PC 加样;
6. 建议使用无菌低吸附带滤芯枪头 (DNase/RNase free)。