

克罗诺杆菌属核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

使用说明书

(使用前请仔细阅读本说明书)

【产品名称】

通用名称: 克罗诺杆菌属核酸检测试剂盒
(PCR-荧光探针法)

英文名称: PCR Detection Kit for
Cronobacter spp. (Fluorescent Probe Assays)

【包装规格】 48 测试/盒

【产品编号】 FZ012BF2

【产品简介】

本试剂盒仅适用于食品中克罗诺杆菌属的定性检测,其他试验需另按照国标《GB 4789.40-2024 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验》开展。

【检测原理】

本产品基于 Real Time PCR 技术,参考 SN/T5364.8-2021 标准,利用针对于克罗诺杆菌属 MMS 基因的引物、荧光探针以及其他反应所需试剂,加入待检样品即可进行扩增反应。在发生扩增过程中,荧光探针与目的基因片段结合,可被 Taq 酶分解并产生荧光信号,此时荧光定量 PCR 仪可识别该荧光信号,同时根据其强弱变化绘制出相应的实时扩增曲线,进而判定克罗诺杆菌是否检出。

【产品组分】

组分名称	规格×数量
裂解液	1 mL×2 管
阳性对照	200 μL×1 管
阴性对照	200 μL×1 管
预混液	1 mL×1 管
说明书	1 份

【储存条件与保质期】

-20℃避光储存,有效期为 12 个月,避免反复冻融。

【灵敏度】

最低检验限达到 10~100 CFU/Test

【所需其他材料和适用仪器】

荧光定量 PCR 仪(具有能够检测 FAM 标记的荧光通道)、高速离心机、移液器、移液枪头及离心管等。

【使用指南】

1. 样品前处理

样品增菌液模板 DNA 的制备

- 根据国标方法将样品置于增菌培养基培养, 36 °C±1 °C 增菌 18~20 h;
- 取以上增菌液 1 mL 到 1.5 mL 规格的无菌离心管中, 6000 r/min 离心 5 min, 完全去除上清;
- 加入 30 μL 裂解液充分悬浮管底沉淀, 轻弹管壁消除气泡, 99°C 加热 10 min;
- 12000 r/min 离心 15 min, 上清即为待测样品 DNA, 静置冰上, 长时间不用应再次离心。-20°C 保存。

可疑菌落模板 DNA 的制备:

- 挑取可疑菌落, 充分悬浮于预先加有 30μL 裂解液的无菌离心管中, 充分悬浮管底沉淀, 轻弹管壁消除气泡, 99°C 加热 10 min。
- 12000 r/min 离心 15 min, 上清即为待测样品 DNA, 静置冰上, 长时间不用应再次离心。-20°C 保存。

2. 加样、反应

- 按照需求取 n 个 PCR 反应管 (n=1 管阴性对照+待检测样品数+1 管阳性对照), 从试剂盒中取出预混液, 充分融化, 涡旋后短暂离心, 以上每管加入 20 μL 预混液, 待用。
- 向上述 n 个反应管中分别加入阴性对照、待测样品 DNA、阳性对照各 5 μL, 总反应体积为 25 μL。盖紧管盖, 短暂离心, 立即进行 PCR 扩增反应。
- PCR 反应体系为 25 μL, 取 FAM 检测通道, 在反应阶段 2 中 60°C 时收集荧光信号, 具体程序如下:

反应阶段	温度	时间	信号收集	循环数
1	94°C	1 min		1
2	95°C	20 sec	√	40
	60°C	30 sec		

注：在反应阶段 2 中 60°C 时收集荧光信号，对于多通道荧光 PCR 仪，取“FAM”为信号采集通道，淬灭基团选择“None”，染料校正选择“None”。

3. 结果

一般情况下，可通过软件自动设定的基线、阈值等直接读取检测结果。如需调整，可根据所使用仪器的自身情况（如噪声等）以及选取的不同荧光通道进行调整。

1) 质量控制：

阴性对照未出现明显的 S 型扩增曲线或 Ct 值 > 40，阳性对照出现 S 型扩增曲线且其 Ct 值 < 30。若阴阳性对照不同时满足上述条件，则本次检测结果无效，应重新检测或与产品技术支持联系。

2) 结果判读：

根据反应所得 Ct 值判读，具体见下表：

Ct 值	每个基因判读结果
≤35	对应的基因阳性。
35~40	建议重新检测，若复测结果 Ct ≥ 37，则对应的基因阴性，反之为阳性。
≥40	对应的基因阴性。

【注意事项】

1. 实验环境条件和过程控制应参照 GB/T 27403《实验室质量控制规范食品分子生物学检测》规定执行。
2. 使用本试剂盒前请仔细阅读本说明书全文，检测过程中建议穿洁净工作服，戴一次性手套，使用的移液枪头需提前灭菌。
3. 试剂盒中试剂使用前需充分融化、混匀，短暂离心后使用，期间需尽量避免产生气泡，加样完毕后检查反应管是否盖紧，避免泄露造成污染。
4. 待检测样品基因变异可能会造成假阴性结果；待检测样品交叉污染、实验室环境污染以及试剂污染均会造成假阳性结果。
5. 不同批号的产品请勿混合使用，请在产品有效期内使用试剂盒，由于操作不当引起的误判，以及由此误判引发的其他事项，本公司概不负责。
6. 检测完毕后，根据相关规定正确处理废弃耗材以及扩增产物。
7. 仅限科研使用。

【生产企业】

企业名称：广东环凯生物科技有限公司
生产地址：广东省肇庆市高新区科技大街中 13 号

邮政编码：526238

技术热线：020-32078333-8877

企业网址：<http://www.bhkbio.com>

E-mail：Webmaster@huankai.com

【说明书修改时间】

2025 年 03 月 27 日

