

分枝杆菌 DNA 检测试剂盒

（PCR-荧光探针法）

说明书

货号：1503602

版本：A/2

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

MycoSHENTEK® 分枝杆菌 DNA 检测试剂盒用于定性检测细胞、细胞制品、疫苗等产品中是否有分枝杆菌污染；与 MycoSHENTEK®分枝杆菌 DNA 提取纯化试剂盒配套使用。

本试剂盒利用荧光探针法 qPCR 技术，定性检测样品中分枝杆菌 DNA，涵盖 100 多种分枝杆菌 DNA 序列；检测限为 100-10CFU；经过多种分枝杆菌、非分枝杆菌和常见工程细胞 DNA 检测，特异性强。本试剂盒含 dUTP，可使用 UNG 酶系统以预防污染，有效避免假阳性结果的出现。

内部质控（IC）可在 PCR 扩增反应阶段加入，以判断待检样品对扩增反应是否存在抑制，防止假阴性结果的产生；也可在样品提取阶段加入，以评估提取效果。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
MB 内部质控（IC）	NNA037	600 µL × 1 管	-18 °C及以下
MB 阳性质控（PC）	NNA041	500 µL × 1 管	-18 °C及以下
MB qPCR Reaction Buffer	NNB011	400 µL × 1 管	-18 °C及以下，避光
MB Primer & Probe MIX	NNC035	75 µL × 1 管	-18 °C及以下，避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL × 1 管	-18 °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，使用前需验证检测灵敏度）

- SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统
- 7500 Real-Time PCR System
- CFX96 定量 PCR 系统

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL 或 2.0 mL 无菌低吸附离心管
- 96 孔 qPCR 板或八联管
- 1000 μ L, 100 μ L, 10 μ L 无菌低吸附带滤芯枪头
- 75%酒精
- UNG 酶 (确定使用前建议验证酶效果)

■ 相关设备

- 超净台或生物安全柜
- 迷你离心机
- 漩涡振荡器
- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μ L, 100 μ L, 10 μ L 移液枪

■ 操作过程

❖ 实验前的准备

1. 穿戴无 DNA 污染的工作服、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
2. 工作台面、移液枪及离心管架紫外照射 30 min, 喷洒 75%酒精并擦干。
3. 将试剂盒从冰箱-18 $^{\circ}$ C 以下区域转移至冰上或 2-8 $^{\circ}$ C 条件下融化, 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) $\times$ 2

2. 根据反应孔数计算所需的 MIX 总量 (含有 2 孔的损失量):

$$\text{MIX} = (\text{反应孔数} + 2) \times 10 \mu\text{L}$$

3. 各试剂放在冰上或 2-8 $^{\circ}$ C 条件下融化, 并根据表 2 所示准备 qPCR MIX:

表 2. qPCR MIX 配制表

组分	单孔用量
MB qPCR Reaction Buffer	8 μL
MB Primer & Probe MIX	1.5 μL
IC	0.5 μL
总体积	10 μL
UNG 酶(可选)	0.1 U

 若样品提取时已加入 IC，则配制 MIX 时应根据表 2 使用等体积的 DNA 稀释液代替 IC。

❖ 加样

1. 将所有溶液在冰上溶解,轻微振荡混匀后根据表 3 所示加样,排版方式可参考表 4:

表 3. 各反应孔加样示例

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

 加样完成后体积为 30 μL /孔。

表 4. 96 孔板排版示例

PC	PC				S1	S1				PCS	PCS	A
					S2	S2						B
					S3	S3						C
					S4	S4						D
					S5	S5						E
					S6	S6						F
					S7	S7						G
NTC	NTC				S8	S8				NCS	NCS	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 96 孔板排版加样。

2. 将 96 孔板用光学膜封闭, 轻微震荡混匀, 短时间快速离心 10 s 后放入 qPCR 仪。

❖ qPCR 程序设置

✧ 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“分枝杆菌检测”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 FAM 探针, 选择报告荧光基团为 FAM, 淬灭荧光基团为 none; 创建 VIC 探针, 选择报告荧光基团为 VIC, 淬灭荧光基团为 none; 选择检测参比荧光为 ROX (可选择)。

2. 设置反应程序: 25 °C UNG 酶作用 10 min; 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s (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. 待测样品、阳性质控 PC、阳性对照样品 PCS 和阴性质控样品 NCS 将样品类型设置为待测样品, NTC 将样品类型设置为无模板对照。

2. 在“实验分析”页面点击 。

3. 在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、阳性质控 PC、阳性对照样品 PCS 以及待测样品的 Ct 值。

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

1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, 选择 Manual Ct, 将 Threshold 设置为 0.02, 选择 Auto Baseline, 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, 将阳性质控 PC 孔、阴性质控样品 NCS 孔、待测样品孔的 Task 一栏设置为 Unknown, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 PC、NTC、NCS, 之后点击 。

-  阈值线设定应基于实验室验证数据，可从满足检测限要求考虑。
-  结果分析的参数设置需依据具体的机型及使用的软件版本，一般也可由仪器自动判读。例如 Bio-Rad 公司 CFX96 型号定量 PCR 仪，软件版本 CFX Manager 2.0，阈值线可设置为 800。

3. PC、NTC、NCS、PCS 检测结果应为：

表 5. 质控结果分析

质控样	FAM 信号	VIC 信号
NTC	2 复孔 Ct≥40 或扩增曲线无明显起	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增
NCS	2 复孔 Ct≥40 或扩增曲线无明显起	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增
PC	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增
PCS	2 复孔 Ct<35 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct<35 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。

4. 待测样品检测结果判定：

表 6. 待测样品检测结果分析

FAM 信号	VIC 信号	结果判断
2 复孔有 1 孔以上 Ct<40 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct<40 且有效的“S”型扩增	阳性
	2 复孔 Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	阳性，有抑制
2 复孔 Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct<40 且有效的“S”型扩增	阴性
	2 复孔 Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	阴阳性无法判断，有抑制

-  VIC 信号如果有抑制，需重测或对样品进行合适处理消除抑制因子。
-  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 03 月 07 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