

致病型唐菖蒲伯克霍尔德氏菌核酸检测试剂盒(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: 致病型唐菖蒲伯克霍尔德氏菌核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

英文名称: Double PCR Detection Kit for Pathogenic *Burkholderia gladioli*(Fluorescent Probe Assays)

【包装规格】 48 测试/盒

【产品编号】 FZ024BF2

【产品简介】

本试剂盒仅适用于食品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌及其产米酵菌酸致病型菌株的定性检测, 毒性试验需另按照国标《GB4789.29-2020 食品微生物学检验-唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)检验》开展。

【检测原理】

基于 Real Time PCR 技术, 利用针对于唐菖蒲伯克霍尔德氏菌特异性的结构域蛋白基因和 Bon 毒力基因的双重特异性引物、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, 进而判定唐菖蒲伯克霍尔德氏菌是否检出。

【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°C 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 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

1) 样品增菌液模板 DNA 的制备:

- 食品样品, 如新鲜银耳、米面制品及其他食品, 无菌操作称取 25g (mL) 样品, 置入盛有 225 mL GVC 增菌液的无菌均质袋中(鲜银耳样品取 1 g, 用剪刀剪碎, 加入盛有 20 mL GVC 增菌液的无菌均质袋中), 用拍击式均质器拍打 1 min~2 min; 或置入盛有 225 mL GVC 增菌液的无菌均质杯中, 以 8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min 若样品为液态, 振荡混匀。将上述样品增菌液置 36°C ± 1°C 培养 20 h~24 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。

2) 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 30 μL 裂解液的无菌离心管中, 后按照上述步骤 c)、d) 操作。

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。

- 3) PCR 反应体系为 25 μ L，取 FAM、VIC 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”“VIC”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 > 35，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。
35~37	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。
≥37	对应的基因阴性。

	FAM-Bon 基因	VIC-结构域蛋白基因	判别结果
1	+	+	致病型唐菖蒲伯克霍尔德氏菌
2	-	+	非致病型唐菖蒲伯克霍尔德氏菌
3	-	-	非唐菖蒲伯克霍尔德氏菌

【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。

【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】

2023 年 5 月 29 日

