

Species-Specific Bacteria qPCR
Detection Kit

特异版细菌检测试剂盒（qPCR 法）

（Species-Specific Bacteria qPCR Detection Kit）

/ 使用说明文件 /

— Instruction manual —



YOCON 友康®

细菌检测试剂盒（qPCR法）

参照中国药典、美国药典、日本药典、《人源干细胞产品指导原则2023》等指南进行相关验证。

-20℃保存

BACTERIA

本产品仅限科研用途

本产品仅限科研用途

YOCON

使用前请仔细阅读本操作说明

友康厚德生物制品（北京）有限公司

YOCON 友康®

特异版细菌检测试剂盒（qPCR法）说明书

【试剂盒简介】

特异版细菌检测试剂盒（qPCR法）基于荧光定量PCR（Taqman探针法）技术，用于定性检测如培养基、细胞培养物以及生物制品中是否有细菌污染。

本试剂盒已验证可检测5种细菌（金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌和大肠埃希菌），且检测限不大于100 CFU/mL。序列比对可匹配近400种验证菌的已知近源细菌，与真菌、支原体和293细胞等人源细胞无交叉反应，具备灵敏度高、特异性好等特点。已根据中国药典qPCR方法检测相关要求进行了验证。

本试剂盒使用两种荧光探针，FAM和ROX，分别检测细菌目标序列和内质控。FAM通道特异性检测细菌，ROX通道检测内质控。内质控可在PCR反应阶段加入，用于排除因样品中含有PCR抑制因素导致的假阴性结果；也可在样品提取阶段加入，用于评估提取效果，排除提取不当而导致的假阴性。

本试剂盒能够与本公司的核酸提取试剂盒搭配使用，提取样品中的细菌DNA，排除不同样本基质的干扰，提高检测的灵敏度。

【试剂盒组成】

表1 试剂盒组分

试剂名称	货号	规格（50 T）
5×Bac 反应液	BacA-50	250 μL×1 管
酶	BacB-50	6.25 μL×1 管
Bac 阳性质控	BacC-50	100 μL×1 管
Bac 内质控	BacD-50	100 μL×1 管
PCR 稀释液	BacE-50	1000 μL×2 管

* 5×Bac反应液保存和使用过程注意避光，所有试剂取用时应避免微生物和核酸污染。

【产品规格】

产品货号：BA0001-50

产品规格：50T/盒

【有效期】

-20℃保存，12个月。

【适用机型】

（包括但不限于以下机型，使用前需进行仪器验证）

* 上海宏石SLAN-48P和SLAN-96S

【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

* 八联管或 96孔qPCR 板

* 1000 μL、200 μL、100 μL、10 μL无菌低吸附带滤芯枪头

* 75%酒精及核酸清除剂

【相关设备】

- * 超净台或生物安全柜
- * 离心机
- * 漩涡振荡器
- * 荧光定量 PCR 仪
- * 不同规格微量移液器

【实验流程】

一、实验前准备

1. 穿戴无DNA污染的工作服、一次性口罩、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
2. 工作区及环境采取适当方式消毒，去除残留核酸。所以设备和耗材转移到相应工作台内，工作台内紫外照射至少30 min，先后喷洒75%酒精和核酸清除剂全面擦拭消毒。
3. 将试剂盒从冰箱-20℃以下区域转移至冰上或2~8℃条件下融化，除组分BacB-50外均需涡旋振荡混匀，所有组分瞬时离心转移到工作台内，实验全程应遵守无菌操作。
4. 实验严格分区操作（阴性区、待测样本区、阳性区和扩增区），相关实验应至少在各区域的超净工作台内操作。阴性区：试剂配制及无模板对照加样区；待测样本区：待测样本及阴性对照加样区（可与样本提取区共用）；阳性区：阳性对照加样区（可以与待测样本区共用，但使用阳性对照时一定要在待测样本加样完成后，阳性对照加样后做好操作区的核酸清除工作）；扩增区：qPCR反应体系的扩增。

二、样本检测

1. 样本准备

① 样本处理1

推荐使用本公司核酸提取试剂盒（货号：MK0103-50）进行样本的核酸提取，提取产物作为待测样本加入检测体系进行检测。提取时每份样本加入2 μL内质控，添加内质控时间点：样本裂解之后，异丙醇加入之前。

② 样本处理2

推荐使用本公司核酸提取试剂盒（货号：MK0104-50）进行样本的核酸提取，提取产物作为待测样本加入检测体系进行检测。提取时每份样本加入10倍稀释后的内质控2 μL，添加内质控时间点以本公司的核酸提取说明书为准。若使用其他品牌提取试剂，需验证提取效率及兼容性。

* 含细胞的样本（浓度 $>10^4$ cell/mL），推荐优先去除过量细胞后再进行核酸提取。（详见提取试剂说明书）

* 阴性对照最好选取同类型无污染样品，避免成分差异。

* 本产品检测的是细菌的核酸。如果待测样本中含有细菌表达的蛋白，检测结果可能会出现阳性（样本中的细菌核酸残留导致），推荐此类样本使用本公司带扩展包的核酸提取试剂盒提取后进行检测。（详见提取试剂说明书）。

2. qPCR反应液准备

使用前阅读说明书并按流程进行操作。

① 确定配制反应孔数（推荐做2个检测重复孔，1个分装损失孔）

推荐配制反应孔数 $N = (\text{待测样品数} + \text{无模板对照} 1\text{个} + \text{阴性对照} 1\text{个} + \text{阳性对照} 1\text{个}) \times \text{重复孔数} + 1$

② qPCR反应液配制（阴性区操作）

试剂准备：试剂盒中的各组分，提前在冰上完全融化、混匀后使用。试剂盒中PCR稀释液分装1 mL放入阳性区使用。

各试剂配制按表2进行，充分混匀后，按照20 μL每管分装到PCR反应管中。

表 2 qPCR反应液配制表

组分	单孔用量	用量
5×Bac 反应液	5 μ L	5 μ L $\times$ N
酶	0.125 μ L	0.125 μ L $\times$ N
PCR 稀释液	14.875 μ L	14.875 μ L $\times$ N
总体积	20 μ L	20 μ L $\times$ N

*所有操作应在阴性区的无菌超净工作台中进行，遵守无菌操作规范。

3.加样

每个反应孔中加入5 μ L模板，总反应体系为25 μ L。

样本直接检测时，内质控用试剂盒中的PCR稀释液稀释后使用（10倍梯度稀释，稀释到 10^{-2} 后使用），现用现稀释，请勿反复冻融使用。

阳性对照、无模板对照、待测样品，具体参考下表进行加样：

表 3 各反应孔加样示

样本类型	加样示例	操作区域
阳性对照	20 μ L qPCR 反应液 +2.5 μ L 阳性质控 +2.5 μ L 内质控（100 倍稀释）	阳性区
无模板对照	20 μ L qPCR 反应液 +5 μ L PCR 稀释液	阴性区
待测样本	20 μ L qPCR 反应液 +5 μ L 待测样本	待测样本区
阴性对照	20 μ L qPCR 反应液 +5 μ L 阴性对照	待测样本区

*加样完成后，立即盖紧管盖，在掌上离心机短时离心，轻弹管底消除气泡后再次离心，尽快上机检测。

*条件允许的实验室可以在样本类型中增加细菌作为阳性对照样本，提取方式与加样方式和待测样本一致，但操作时需与待测样本严格分开，结果判定方式与表5阳性质控一致。

4.qPCR扩增

将qPCR反应管放入扩增仪器样品槽，按照对应顺序设置无模板对照、阳性对照、待测样品。读取FAM通道和ROX通道，反应体积设置为25 μ L，反应程序：

表 4 qPCR反应程序

反应阶段	温度	时间	循环数
预变性	95°C	1 min	1
变性	95°C	5 sec	45
退火 / 延伸（荧光信号采集）	63°C	15 sec	

*分析参数示例：SLAN-48P/96S宏石的FAM通道阈值线推荐0.05，其他参数如有需要亦可自行在合理范围内进行调整。如在其它设备上使用，需完成仪器适用性验证，遇到问题可与我公司技术人员联系。

*在使用试剂盒的阳性对照进行仪器的适用性验证时，推荐将FAM和ROX通道的阈值线调整为阳性对照在相应通道上最大荧光强度的10%。

*荧光信号采集时间不少于15 sec，部分仪器无法设到15 sec，也可采用仪器荧光信号采集的最短时间。

5.结果分析

本试剂盒设置阳性对照、阴性对照和无模板对照作为质控，阳性对照、阴性对照和无模板对照判定结果应满足表5：

表 5 质控结果判定

质控样本	FAM通道	ROX通道
阴性对照	Ct 值 >43	Ct 值 <35
阳性对照	Ct 值 <35	Ct 值 <35
无模板对照	Ct 值 >43	Ct 值 >35

*阴性对照、阳性对照和无模板对照结果符合表5的判定结果后，才能对待测样本进行结果判定；如结果与表5不符，待测样本的判定结果不可靠，需要分析原因后重新安排检测。

表 6 待测样本结果判定

FAM 通道	ROX 通道	结果判定
Ct 值 <40	无关	阳性
Ct 值 >43	Ct 值 <35	阴性
Ct 值 ≥ 40	Ct 值 >35	qPCR 抑制，样本重复提取及 qPCR 检测。
边界值 (40 ≤ Ct 值 ≤ 43)	Ct 值 <35	可能存在较低浓度的细菌污染，或可增加样本处理量重复提取及 qPCR 检测，结果仍保持一致，则判定为阳性。

*数据均为2复孔检测结果，2复孔结果同时满足表6条件，可依表6做结果判定。

表 7 异常结果判定

FAM 通道		ROX 通道	结果判定
复孔 1	复孔 2	复孔 1、2	
边界值 (40 ≤ Ct 值 ≤ 43)	Ct 值 >43	Ct 值 <35	增加样本重复提取及 qPCR 检测，结果优先依表 5、6 进行判定，如不少于 1 复孔 Ct 值 <40，或 2 复孔均为边界值时，样本为阳性，其他结果样本判定为阴性。
Ct 值 <40	Ct 值 >43		
	边界值 (40 ≤ Ct 值 ≤ 43)		

* 增加样本推荐用量为第一次提取时的10倍，通过15000×g离心10 min去除部分上清，余下的沉淀及上清应满足提取用量。

*如遇特殊样品或其他异常现象，结果难以判读，请联系友康生物，咨询具体解决方案。

*如果样本单孔检测，可依据表5、6及表7复孔1进行结果判定。

【注意事项】

1. 本产品仅供科研使用。
2. 使用本试剂前请仔细阅读说明书，实验应规范操作，包括样本处理、反应体系的配制及加样，严格按照说明书步骤操作。
3. 实验室管理需尽量遵照PCR基因扩增实验室的管理规范，实验人员需进行专业培训，实验过程严格分区进行，各区各阶段不可交叉使用，避免阳性质控、阳性样本、内质控对检测体系的污染，所有消耗品仅作一次性使用。
4. 整个检测环境必须在无菌和无核酸污染的条件下完成，所有工作台、仪器设备、试剂耗材需要提前清洁杀菌，所有物品移入工作台之前均需要经过严格的清洁杀菌处理。
5. 反应管完成反应后，请勿打开反应管盖子。样品操作、废弃物处理应符合相关法规要求。
6. 请在有效期内使用试剂盒，不同批号的试剂组分不可以互换使用。

【参考文献】

1. 中国药典2020版：1101 无菌检查法
2. 中国药典2020版：9201 药品微生物检验替代方法验证指导原则
3. 《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》
4. 《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》
5. 美国药典 USP44<71>: Sterility Tests
6. 日本药典 JP17<4.06>: Sterility Tests
7. 聚合酶链反应（PCR）检验实验室检查要点指南（2016版）



文件版本号：2024 -V1.0.2

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

生产企业：友康厚德生物制品（北京）有限公司

生产地址：北京市密云区科技路6号

联系电话：400-001-1266 010-58711655

公司网站：www.yocon.cn

