

蜡样芽孢杆菌核酸检测试剂盒（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：蜡样芽孢杆菌核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

英文名称：Rapid Detection Kit for *Bacillus cereus* (Fluorescent Probe Assays)

【包装规格】48 测试/盒

【产品编号】FZ023BF2

【产品简介】

本试剂盒仅适用于食品中蜡样芽孢杆菌的定性检测。

【检测原理】

基于 Real Time PCR 技术，利用针对蜡样芽孢杆菌 16s rRNA、gyrB 基因设计特异性引物、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，进而判定蜡样芽孢杆菌是否检出。

16s rRNA、gyrB 基因分别对应荧光报告基团 VIC、FAM。

【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 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 VIC、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：

- 参照 GB《4789.14-2014 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》处理食品样品，使用胰酪胨大豆多黏菌素肉汤进行增菌，增菌时间不低于 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℃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 MYP 琼脂平板上可疑菌落，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。

➤ 以上 2 个 DNA 纯化使用商品化的试剂盒提取 DNA 效果更佳。

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 VIC、FAM 检测通道，在反应阶段 2 中 60℃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	95℃	30 sec		1
2	95℃	5 sec	√	40
	60℃	40 sec		

注：在反应阶段 2 中 60℃时收集荧光信

号，对于多通道荧光 PCR 仪，取荧光素“VIC”、“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 >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	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。

VIC -16S	FAM -gyrB	判读 结果
+	+	阳性
—	+/-	阴性
+/-	—	

注：多重 qPCR 检测可能出现不同荧光通道之间竞争抑制的问题，单基因分析时适当调整阈值线

【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：www.bhkbio.com
 E-mail: Webmaster@huankai.com

【说明书修改时间】

2022 年 11 月 3 日