



克罗诺杆菌属核酸检测试剂盒 (实时荧光 PCR 法) 说明书

【产品名称】

通用名称：克罗诺杆菌属核酸检测试剂盒（实时荧光 PCR 法）

英文名称：Real-time PCR Diagnostic Kit for Rapid Identification of *Cronobacter* spp.

【产品货号】MX-1301

【包装规格】24 次反应/盒

【运输及保存】

1. 运输：常温或冷藏运输
2. 保存：2°C-8°C 冷藏保存（长期不用时建议 -20°C 保存）
3. 有效期：24 个月

【用途】

本产品为克罗诺杆菌属核酸检测试剂盒（实时荧光 PCR 法），可对样品中克罗诺杆菌属的特异 DNA 核酸片段进行特异性扩增，通过 Ct 值判断样品中是否含克罗诺杆菌属。

【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，通过克罗诺杆菌属特异性引物对克罗诺杆菌属进行特异性扩增，荧光标记的特异性的探针对扩增产物进行标记跟踪，实时在线监控反应过程，结合相应的软件可以对产物扩增与否进行分析。

【试剂盒内容】

序号	产品组成	规格
1	PCR 冻干粉	24 次反应/管
2	RNase-Free ddH ₂ O	1mL/管
3	裂解液	5mL/瓶
4	空白 PCR 管	8 管/排×3

【自备材料】

灭菌 1.5mL 离心管；灭菌 0.2mL PCR 管及枪头；碎冰或者冰盒；微量移液器；离心机；涡旋振荡器；金属浴；灭菌超纯水。

【操作步骤】

1. 样本制备

a) 增菌液检测：取增菌液 1ml 于 1.5mL 离心管中，3000×g 离心 10 分钟或 10000×g 离心 2 分钟，弃去上清，取沉淀加入 1 管（200μL）裂解液，涡旋混匀，金属浴 99°C 裂解 10min，12000×g 离心 2min，取上清即为模板。

b) 菌落检测：用接种环取一环菌落，溶于 200μL 裂解液中，涡旋混匀，金属浴 99°C 裂解 10min，12000×g 离心 2min，取上清即为模板。

2. 反应体系配制

① 从试剂盒中取出 PCR 冻干粉，每管加入 RNase-Free ddH₂O 575μL，震荡混匀。（如一次用



量较少，可分装到离心管中-20℃保存)

②取步骤 2 ①中的 23μL 反应体系加入到空白 PCR 管中。

③取步骤【样本制备】中提取的 2μL DNA 样品加入到 PCR 管中，总反应体积为 25μL。

④阳性对照、阴性对照和空白对照体系分别加入相应的阳性对照、阴性对照和 RNase-Free ddH₂O 2μL。全部试剂及模板加样完成后快速离心，使整个体系均在 PCR 管底部。

3.反应条件

阶段	循环数	温度	时间	步骤	荧光信号 [#] 采集
预变性	1	95℃	3 min	预变性	否
Real-time PCR	40	95℃	30 sec	变性	否
		60℃	30 sec	退火	是

[#]：克罗诺杆菌属特异性基因荧光基团为 FAM、淬灭基团为 TAMRA。

【结果分析与判定】

空白对照：无FAM荧光信号检出，未出现典型的扩增曲线。

阴性对照：无FAM荧光信号检出，未出现典型的扩增曲线。

阳性对照（含致病基因）：有FAM荧光信号检出，出现典型的扩增曲线，Ct值<30.0。

以上需同时满足，否则本次实验无效。

样品检测结果：

Ct值≥35，判定结果为阴性；

Ct值<30，并出现典型的扩增曲线，判断样品为阳性；

30≤Ct值<35，并且出现典型的扩增曲线，则重新提取DNA检测。再次检测结果仍为30≤Ct值<35，则判定样品为阳性；Ct值≥35，判定结果为阴性。

【注意事项】

- 1.PCR 检测试剂对光敏感，应在 2℃-8℃冷藏避光保存；
- 2.试剂配制及加样应在特定区域进行，该区域应与 PCR 扩增和电泳区域严格分离；
- 3.试剂配制及加样应在冰上操作；
- 4.反应结束后，扩增管请置于密封袋中并丢弃，切勿带到加样区域；
- 5.本产品仅适用于实验室的工业、科研目的，不用于临床诊断或治疗。