



克罗诺杆菌PCR检测试剂盒说明书

【产品名称】

通用名称: 克罗诺杆菌PCR检测试剂盒

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

【产品货号】MX-1801

【包装规格】24 次反应/盒

【用途】

本试剂盒用于克罗诺杆菌核酸的体外检测。实验结果仅为基础研究提供参考, 不作为临床诊断依据。

【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

【检验原理】

本试剂盒采用PCR 技术, 适用于克罗诺杆菌的体外检测。每个反应体系均含有克罗诺杆菌内转录间隔区 (*its*) 基因检测的引物, 根据PCR扩增产物电泳是否出现预期大小 (282bp) 的扩增条带来判定菌株是否为克罗诺杆菌PCR结果阳性。

【试剂盒内容】

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

【操作步骤】

1. 样本制备:

方法①: 参照 GB 4789.40-2024检验中5.3.1中所述制备;

方法②: 按照本说明书进行制备, 方法如下:

a) 增菌液检测: 取增菌液 1mL于1.5mL 离心管中, 3000×g 离心 10min 或 10000×g 离心2min, 弃去上清, 加入 200μL 裂解液, 涡旋混匀, 金属浴 99°C或沸水浴裂解 10min, 冰浴冷却后 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 200uL 裂解液中, 涡旋混匀, 金属浴 99°C或沸水浴裂解10min, 冰浴冷却后 12000×g 离心 2min, 取上清即为模板, 建议稀释至约100ng/uL。

2. 反应体系配制

- ①从试剂盒中取出试剂到室温, 每管加入RNase-Free ddH₂O 575μL, 震荡混匀。
- ②取步骤2 ①中的23μL反应体系加入到PCR管中。
- ③取步骤1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、阴性对照和无菌去离子水2 μ L。

3. PCR反应条件:

阶段	循环数	温度	时间	步骤
PCR	1	94°C	5 min	预变性
	35	94°C	30 sec	变性
		61°C	30 sec	退火
		72°C	30 sec	延伸
	1	72°C	5 min	延伸
保存	1	4°C	--	保存

【电泳】

用1 $\times$ TAE 电泳缓冲液制备含核酸染色剂的1.5% 琼脂糖电泳凝胶（核酸染色剂按照说明书要求使用）。在电泳槽中加入电泳缓冲液, 使液面没过胶面。将适量 PCR 扩增产物与6 $\times$ 加样缓冲液混合后点样, 其中第1 孔加入100bp DNA ladder。电压的设置根据公式——电泳槽正负极的距离(cm) $\times$ 5 V/cm计算并设置, 电泳时间为20 min-30 min。使用凝胶成像系统或紫外检测仪观察和记录结果。也可采用毛细管电泳仪等设备进行电泳。

【结果分析与判定】

- **质控系统:** 阴性对照和空白对照均未出现扩增条带, 阳性对照出现预期大小（282bp）的扩增条带, 则检测系统正常。任一种对照出现非上述正常结果, 应重做试验, 同时排除干扰因素。
- **阳性结果:** 在质控系统正常的情况下, 待测样品出现预期大小（282bp）的扩增条带, 判定PCR结果为阳性。
- **阴性结果:** 在质控系统正常的情况下, 待测样品未出现预期大小（282bp）的扩增条带, 判定PCR结果为阴性。
- 每次PCR鉴定时使用克罗诺杆菌标准菌株DNA模板作为阳性对照, 大肠埃希氏菌标准菌株DNA模板作为阴性对照, 提取过程设置灭菌去离子水作为DNA提取空白对照, PCR反应需另设灭菌去离子水作为PCR反应体系空白对照。

【检测方法的局限性】

本试剂盒检测的靶序列为克罗诺杆菌基因的保守区域, 这些基因高度保守稳定。如果细菌在靶序列处发生基因突变, 则可能出现假阴性结果, 即发生漏检; 同时, 样品收集、处理、运送和保存的质量均会对检测结果造成影响。

【注意事项】

- 1.实验前请仔细阅读本试剂盒说明书, 严格按操作步骤执行。
- 2.试剂盒内各组分在使用前应充分融化混匀并经高速短暂离心后使用。
- 3.试剂盒必须避光保存, 所使用的离心管、Tip头应高压灭菌, 且不含DNase和RNase。整个操作过程和PCR实验室的软硬件设施应符合卫计委颁发《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》、《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》等法规的要求。并恰当处理试验过程中产生的废物和扩增产物, 防止交叉污染。
- 4.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。