



## 单核细胞增生李斯特氏菌核酸检测试剂盒 (实时荧光 PCR 法) 说明书

### 【产品名称】

通用名称: 单核细胞增生李斯特氏菌核酸检测试剂盒(实时荧光 PCR 法)

英文名称: Real-time PCR Diagnostic Kit for Rapid Identification of *Listeria monocytogenes*

### 【产品货号】MX-1501

### 【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】

单核细胞增生李斯特氏菌是革兰氏阳性无芽孢杆菌, 对人有致病性。单增李斯特氏菌广泛存在于土壤、水、植物、人和动物粪便中, 中毒症状严重, 对机体伤害极大。畜禽产品、蛋、乳制品、蔬菜及各种肉类食品是单增李斯特氏菌的主要污染源。

### 【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术, 适用于单核细胞增生李斯特氏菌核酸的体外检测。每个反应体系均含有单核细胞增生李斯特氏菌特异性引物探针, 根据荧光定量 PCR 扩增产物的 CT 值来判定菌株是否为单核细胞增生李斯特氏菌。

### 【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 <sub>2</sub> O	1mL/管×1
3	裂解液	5mL/瓶×1
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:

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 200μL 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。

#### 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 ddH<sub>2</sub>O 575μL, 震荡混匀。(如一次用量较



少，可分装到离心管中-20°C保存)

②取步骤 2 ①中的 23μL 反应体系加入到 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 ddH<sub>2</sub>O 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 <sup>#</sup> 采集
预变性	1	95°C	3 min	预变性	否
Real-time PCR	40	95°C	30 sec	变性	否
		60°C	30-60 sec*	退火	是

\*：使用不同型号仪器进行时间设定时，请按照仪器使用说明书要求进行实验操作，一般设定在 30 sec。

<sup>#</sup>：单核细胞增生李斯特氏菌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。

### 【检测方法的局限性】

本试剂盒检测的靶序列为单核细胞增生李斯特氏菌基因的保守区域，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。