

单核细胞增生李斯特氏菌荧光 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-1123-1

单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)简称单增李斯特菌，是一种革兰氏阳性杆菌，属人畜共患病病原菌。感染后主要表现为败血症、脑膜炎和单核细胞增多。单核细胞增生李斯特氏菌广泛存在于自然界中，食品中存在的单增李氏菌对人类的安全具有危险，该菌在 4℃ 的环境中仍可生长繁殖，是冷藏食品威胁人类健康的主要病原菌之一，因此，在食品卫生微生物检验中，必须加以重视。

为了适应单核细胞增生李斯特氏菌快速检测和疫病研究的需要，本公司参考 2007 年国家质量监督检验检疫总局发布的中华人民共和国出入境检验检疫行业标准（SN/T 1870-2007）《食品中致病细菌检测方法-实时 PCR 法》中规定的引物和探针序列，经多次实验及系统优化，开发生产了本试剂盒。应用本试剂盒进行检测具有快速、灵敏、特异、准确、安全操作简单、应用广泛和高通量检测等特点及优点。

2、试剂盒组成

试剂盒具体组成如下（50 test/盒）：

组成成分	体积
DEPC 水	5 mL×1 管
单增李斯特菌荧光 PCR 反应液	800 μL×1 管
Taq 酶(5 U/uL)	30 μL×1 管
阴性对照	1 mL×1 管
单增李斯特菌荧光阳性对照	1 mL×1 管

***保存条件：试剂盒须在-20℃保存。**

3、样本采集，存放及运输

3.1 样本采集：样品制备、增菌和分离的具体步骤及试剂配方请参照SN/T 0184.1-2005。

3.2 存放：制备好的菌液样本在2℃-8℃条件下保存应不超过24 h；加入15%-20%甘油可于-70℃以下长期保存。

3.3 运输：密封运输，严防泄露污染。

4、检测步骤

4.1 DNA 核酸提取操作方法(在样本处理区进行)：

4.1.1 待检样品增菌处理后，取 n 个 1.5 mL 灭菌 Eppendorf 管，其中 n 为待检样品数、一管阳性对照和一管阴性对照之和，对每个管进行编号标记，加入对应样品 1 mL；

4.1.2 于 8,000 r/min 离心 5 min，去上清；

公司地址：	联系电话: 400-895-2698	公司主页：
北京市海淀区香山路中国林业科学研究	010-62824033	www.halcyonbio.com
院林木遗传育种国家重点实验室 B 座	传 真：010-62824033	在线 QQ 客服：
邮政编码：100091	邮 箱：haisentong@126.com	737481857
		1632557907

4.1.3 加入灭菌生理盐水洗涤 2 次，最后用 1 mL 灭菌生理盐水悬浮；

4.1.4 将样品置于 100℃ 干浴或沸水浴 5 min，12,000 r/min 离心 5 min，

4.1.5 吸取上清，即为提取的 DNA，冰上保存待用（提取的 DNA 需在 2 h 内进行 PCR 扩增或放置于 -70℃ 冰箱内保存）。

注：细菌核酸提取可选配细菌 DNA 柱式提取试剂盒（货号：SK-CE-1），效果更好。

4.2 荧光 PCR 检测

4.2.1 扩增试剂准备（在反应混合物配制区进行）：

从试剂盒中取出相应的荧光 PCR 反应液、Taq 酶，2,000 g 离心 5 s。每个样品测试反应体系配制见下表。

试剂	荧光 PCR 反应液	Taq 酶	合计
用量	14.5 μL	0.5 μL	15 μL

4.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个荧光 PCR 管孔中各分装 15 μL 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 10 μL，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。

4.2.3 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：第一阶段，95℃/3 min；

第二阶段，95℃/5 sec，60 °C/40 sec，40 个循环，在第二阶段每次循环的退火延伸时收集 FAM 荧光。试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

5、结果判定

5.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

5.2 质控标准

阴性对照无扩增曲线、无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 40。

阳性对照的 Ct 值应 < 30，并出现典型的扩增曲线。否则，此次实验视为无效。

5.3 结果描述及判定

阴性：阴性对照无扩增曲线、无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 40，示样品中无单核细胞增生李斯特氏菌。

阳性：Ct 值 ≤ 35，且出现典型的扩增曲线，示样品中存在单核细胞增生李斯特氏菌。

有效原则：40 > Ct > 35 的样本建议重做。

6、相关技术信息

F: 5'-CTGAATCTCAAGCAAAACCTGGT-3'

R: 5'-CGCGACCGAAGCCAACTA-3'

PROBE: 5'-FAM-ATACGATAACATCCACGGCTCTGGCTGG-TAMRA-3'

公司地址：

北京市海淀区香山中路中国林业科学研究
院林木遗传育种国家重点实验室 B 座

邮政编码：100091

联系电话: 400-895-2698

010-62824033

传 真：010-62824033

邮 箱：haisentong@126.com

公司主页：

www.halcyonbio.com

在线 QQ 客服：

737481857

1632557907