天净沙系列

CAT#:17-62820-stx1

低温运输，-20℃保存

天净沙

肠出血性大肠杆菌 O157:H7 血清型 *stx1* 基因探针法 qPCR 试剂盒

Enterohemorrhage Escherichia coli O157:H7 *stx1* Gene Probe qPCR Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

肠出血性大肠杆菌 O157：H7 （*Enterohemorrhage Escherichia coli* O157:H7，EHEC O157:H7）是一种新型致病性大肠杆菌，由其引发的肠出血性感染性腹泻是近年来新发现的极具危害的肠道传染病。它能产生一类强效毒素，称为志贺毒素（Shiga toxin, STX），STX1 为其中一种。该毒素具有强烈的细胞毒性除了会引起腹泻、出血性肠炎之外，还可能引发溶血性尿毒综合征、血栓性血小板减少性紫癜等严重并发症。肠出血性大肠杆菌 O157：H7 的 STX1 毒素对人类健康构成严重威胁。因此快速检测 EHEC O157:H7 的 *stx1* 基因具有重要的意义。为此，本公司以探针法 qPCR 技术为基础针对其 *stx1* 基因开发了的检测试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板
2. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于制备标准曲线和用作扩增对照，排除假阴性结果。
4. 含识别内源性内参的引物和探针，便于排除 PCR 假阴性结果。
5. 特异性高，靶分子的引物和探针是根据 EHEC O157:H7 血清型 stx1 基因 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。
7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	981201	500 μL	0.5 mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
EHEC O157:H7 血清型 *stx1* 基因 qPCR 引物-探针干粉(含内参引物探针)	17-62820-stx1	50 次	0.5 mL 白盖管
EHEC O157:H7 血清型 *stx1* 基因 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/μL)	Pc62820-stx1	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	sc17-62820-stx1	1 份	无

注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 220 μL 超纯水充分混匀后得到引物-探针混合液再使用，未用完的需要-20℃保存。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备物品

样品 DNA。

使用方法

一、稀释标准曲线样品（以阳性对照 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例）。

1. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。
2. 在各管中加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液。
3. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线阳性样品。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

6. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是制备 PC（样品制备阳性对照），一个是制备 NC（样品制备阴性对照）。可以用确认是阳性的样本作为阳性对照，用确认是阴性的样本作为阴性对照。
7. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容，也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

8. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），6 个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复，则标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 PCR 阳性对照（直接用第 5 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
9. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复）：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
EHEC O157:H7 血清型 *stx1* 基因 qPCR 引物-探针混合液(含内参引物探针)	各 4 μL	4 μL	4 μL
N+2 个待测样（含内源性内参）	各 6 μL	不加	不加
超纯水	不加	6 μL	不加
第 5 步所得标准曲线样品稀释液 （含内参，1-6 号）	不加	不加	各 6 μL (2 号样到 2 号管，3 号样到 3 号管…)

10. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR:

过程	温度	时间
预变性	95℃	4 min
PCR 反应 （40 个循环）	95℃	15 sec
	60℃	45 sec（采集 FAM 通道和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 BHQ）

注：部分（如：伯乐 CFX96）机型如果两步法效果不理想可采用三步法：95℃ 4 分钟，（94℃ 15 秒、X℃ 15 秒、72℃ 30 秒）循环 35-45 次，每个循环第三步采集荧光信号。

四、数据处理

11. 阴性阳性判断：没有 Ct 读数，或 Ct 大于 40 判为阴性结果。有 Ct 读数，Ct 值小于 40，荧光信号有对数增长，有典型扩增曲线判为阳性结果。每个样本需要对 FAM 通道和 Cy5 通道的结果分别进行判定，得到两个结果。
12. 实验有效性判断：如果扩增阳性对照或制备阳性对照 FAM 通道结果为阴性则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析原因，可能是操作、仪器和试剂三方面的原因，重做扩增或制备或跟仪器和试剂厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照 FAM 通道结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要分析失败原因，直到污染消除。如果阳性对照和阴性对照正常，则进入下一步分析样本的有效性。
13. 样本有效性判断：如果样本 FAM 通道的结果为阳性，则无论内参 Cy5 通道的结果是阴性还是阳性，样本的结果均有效。如果样本结果为阴性，内参通道结果也为阴性，则此样品的阴性结果无效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。
14. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的 log 值为横轴，分别以阳性对照 FAM 通道和内参 Cy5 通道的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线为斜线，r2 必须大于 0.95，内参 Cy5 通道读数的标准曲线为一条跟 X 轴平行的横线。再以待测样品的 Ct 值从阳性对照 FAM 通道读数的标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。
15. 如果用于定性实验，对待测样品，如果其 FAM 通道的 Ct 没有读数、或 Ct 大于或等于 40 则均为阴性，如果小于 40 则为阳性。对任何 FAM 通道结果为阴性的待测样本，如果其对应的内参 Cy5 通道也为阴性，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。

关联产品	肠出血性大肠杆菌 O157:H7 血清型探针法 qPCR 试剂盒