天净沙系列

CAT#:15-39800-5

低温运输，-20℃保存

天净沙

EAEC/EHEC/EIEC/EPEC/ETEC 五种致泻大肠埃希氏菌探针法 qPCR 检测试剂盒

Diarrheagenic Escherichia coli Quantiplex Probe qPCR Typing 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

致泻性大肠杆菌(*Diarrheagenic Escherichia coli*，DEC，致泻性大肠埃希氏菌)是引起引起肠道内急性腹泻的大肠杆菌统称。我国发生的食物中毒事件中，细菌性食物中毒的人数最多，占总中毒人数的 42.8%，致泻性大肠杆菌根据其毒力因子、致病机理和流行病学特征可分为 5 类,分别是肠道聚集性大肠杆菌(*Enteroaggregative Escherichia coli*，EAEC)、肠道致病性大肠杆菌(*Enteropathogenic Escherichia coli*，EPEC)、肠道侵袭性大肠杆菌(*Enteroinvasive Escherichia coli*，EIEC)、肠道出血性大肠杆菌(*Enterohemorrhagic Escherichia coli*，EHEC)、产肠毒素大肠杆菌(*Enterotoxigenic Escherichia coli*，ETEC)。感染致泻性大肠杆菌型别不同，临床症状也有一定的差异，给针对性治疗带来困扰。因此快速检测和对致泻性大肠杆菌进行分型具有重要意义。本产品就是为满足此需求的探针法 PCR 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，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高,引物是根据致泻性大肠杆菌 DNA 高度保守区设计,不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
5. 可以用于分型，两管式扩增，一次能区分 5 种致泻性大肠杆菌。
6. 用于定量检测和分型，不建议用于定量。分型后可以再另购定量试剂盒。
7. 本产品足够 100 次 20 μL 体系的两管式 5 重探针法 qPCR 反应，足够检测 50 个样本（算上对照，每个样本测两次）。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用十一孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL×2	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
三重致泻性大肠杆菌探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉 (EAEC、EPEC、EIEC)	yp15-39800-5a	50 次	0.5 mL 棕塑盖
双重致泻性大肠杆菌探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉 (ETEC、EHEC)	yp15-39800-5b	50 次	0.5 mL 棕色管
EAEC 探针法 qPCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc15-39800-5eaec	250 μL	0.5 mL 黄盖管
EPEC 探针法 qPCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc15-39800-5epec	250 μL	0.5 mL 黄盖管
EIEC 探针法 qPCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc15-39800-5eiec	250 μL	0.5 mL 黄盖管

ETEC 探针法 qPCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc15-39800-5etec	250 μL	0.5 mL 黄盖管
EHEC 探针法 qPCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc15-39800-5ehec	250 μL	0.5 mL 黄盖管
超纯水	210806	400 μL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	sc15-39800-5	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 165 μL 的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。

自备试剂

样品 DNA，超纯水，核酸纯化试剂盒。

使用方法

一、样品 DNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10μL 试剂盒提供的阳性对照再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为样本制备的 PC。另外用水作为样本制备的 NC。
2. 用自选方法纯化样品的 DNA。本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的核酸纯化试剂盒。

二、设置三重 Probe qPCR 反应（20 μL 体系）

3. 首次使用本产品时，需要在本试剂盒提供的两管引物探针干粉管中，各加入 165 μL 自备的超纯水，涡旋震荡 30 秒混匀后放冰上待用。没有用完的部分需要放-20℃。
4. 如果每个样本只做 1 次重复，则需要 N+2 个管用于 N+2 个样本，另外 1 个管用于 PCR 阴性对照（用水做模板），最后 1-5 个管用于 PCR 阳性对照（试剂盒提供 5 种 DEC 的阳性对照，用户可以任意选择 1-5 种）。分别在各管加入：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	1-5 PCR 阳性对照管
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL
三重致泻性大肠杆菌探针法 qPCR 引物-探针混合液（EAEC、EPEC、EIEC）	各 3 μL	3μL	3 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加
自备超纯水	不加	7 μL	不加
大肠杆菌探针法 qPCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL)（从提供的 5 种中任选 1-5 种）	不加	不加	7 μL

三、设置双重 Probe qPCR 反应（20 μL 体系）

5. 如果每个样本只做 1 次重复，则需要 N+2 个管用于 N+2 个样本，另外 1 个管用于

PCR 阴性对照（用水做模板），最后 1-5 个管用于 PCR 阳性对照（试剂盒提供 5 种 DEC 的阳性对照，用户可以任意选择 1-5 种）。分别在各管加入：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	1-5 PCR 阳性对照管
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL
双重致泻性大肠杆菌探针法 qPCR 引物-探针混合液（EHEC、ETEC）	各 3 μL	3 μL	3 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加
自备超纯水	不加	7 μL	不加
大肠杆菌探针法 qPCR 阳性对照(1E4 拷贝/μL) （从提供的 5 种中任选 1-5 种）	不加	不加	7 μL

四、Probe qPCR 反应（20 μL 体系）

6. 将三重 PCR 和双重 PCR 反应管盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR:

过程	温度	时间
预变性	95℃	10 min
PCR 反应 （45 个循环）	95℃	10 sec
	X℃	X sec
	60℃	60 sec（采集 FAM、HEX、Texas Red 三个通道的荧光信号，设置 TAMRA 为淬灭基团）

四、数据处理

7. 阴性对照 Ct 必须没有数值，等于或者大于 40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于 40。如果不符合上述要求，则整个实验无效，需要重做或者跟厂家联系。
8. 如果对照合格，则实验有效，可以分析待测样本。
9. 对待测样本，如果其所对应的荧光信号的 Ct 小于 40 则为阳性。如果没有 Ct 值，或大于或等于 40 则为阴性。
10. 对阳性的样本，按其阳性的荧光信号确定其分型：

PCR	荧光信号	所属分型
三重 PCR	FAM	EAEC
	HEX	EPEC
	Texas Red	EIEC
双重 PCR	FAM	EHEC
	HEX	ETEC

关联产品 致泻性大肠杆菌染料法 qPCR 试剂盒