天净沙系列

CAT#:15-39590-7

低温运输，-20℃保存

天净沙

产志贺毒素大肠埃希氏菌七重实时荧光 PCR 分型试剂盒

Shiga Toxin-Producing *E. coli* Sevenplex Real-Time Fluorescent PCR Typing Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙血清型科技有限公司

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

产品及特点

本产品是针对产志贺毒素大肠埃希氏菌(Shiga Toxin-Producing *E. coli*, STEC) O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157 七个致病血清型，以探针法 PCR 技术为基础开发的分型试剂盒，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，引物根据 STEC O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157 七个致病血清型的 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品只用于定性检测，不推荐用于定量检测。
6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 PCR 反应。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用十一孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×探针法多重 PCR 预配液	240105	0.5 mL	0.5 mL 本色盖
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿色盖
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝色盖
STEC O26、O45、O103 探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉	yp15-39590-7pt1	50 次	0.5 mL 棕色盖
STEC O111、O121 探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉	yp15-39590-7pt2	50 次	0.5 mL 棕色盖
STEC O145、O157 探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉	yp15-39590-7pt3	50 次	0.5 mL 棕色盖
STEC O111 血清型 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc39590-O111	50 μL	0.5 mL 黄色盖
STEC O26 血清型 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc39590-O26	50 μL	0.5 mL 黄色盖
STEC O45 血清型 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc39590-O45	50 μL	0.5 mL 黄色盖
STEC O103 血清型 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc39590-O103	50 μL	0.5 mL 黄色盖
STEC O121 血清型 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc39590-O121	50 μL	0.5 mL 黄色盖
STEC O145 血清型 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc39590-O145	50 μL	0.5 mL 黄色盖
STEC O157 血清型 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	pc39590-O157	50 μL	0.5 mL 黄色盖
使用手册	15-39590-7sc	1 份	无

注意：在使用前需要短暂离心引物-探针干粉管，然后分别在两只引物-探针混合液干粉离心管中

	各加入 275 μL 的超纯水充分混匀后再使用，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。

使用方法

一、样品 DNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，最好设置 N+8 个提取，多出的七个是已知为 STEC O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157 七个血清型阳性的 PPC（样品制备阳性对照），一个是 PNC（样品制备阴性对照），可以用自备的、确定是阴性的样本作为 PNC，也可以用水替代。
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 O26、O45、O103 三重 Probe PCR 反应（20 μL 体系）

3. 如果每个样本只做 1 次重复，则需要标记（N+8）+ 4 个 PCR 管，多出的四个中三个用于 O26、O45、O103 血清型的 APC（PCR 扩增阳性对照），一个用于 ANC（PCR 扩增阴性对照）。分别在各管加入：

成分	样品管 N+6 个	ANC	O26 *APC*	O45 APC	O103 APC
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
STEC O26、O45、O103 探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉	各 5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 1.6 μL	不加	不加	不加	不加
超纯水	各 3.4 μL	5 μL	3.4 μL	3.4 μL	3.4 μL
STEC O26 血清型 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	1.6 μL	不加	不加
STEC O45 血清型 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	1.6 μL	不加
STEC O103 血清型 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	不加	1.6 μL

四、设置 O111、O121 双重 Probe PCR 反应（20 μL 体系）

4. 如果每个样本只做 1 次重复，则需要标记（N+8）+ 3 个 PCR 管，多出的三个中两个用于 O111、O121 血清型的 APC，一个用于 ANC。分别在各管加入：

成分	样品管 N+6 个	ANC	O111 APC	O121 APC
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
STEC O111、O121 探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉	各 5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 2.5 μL	不加	不加	不加

超纯水	各 2.5 μL	5 μL	2.5 μL	2.5 μL
STEC O111 血清型 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	2.5 μL	不加
STEC O121 血清型 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	2.5 μL

五、设置 O145、O157 双重 Probe PCR 反应（20 μL 体系）

5. 如果每个样本只做 1 次重复，则需要标记（N+8）+ 3 个 PCR 管，多出的三个中两个用于 O145、O157 血清型的 APC，一个用于 ANC。分别在各管加入：

成分	样品管 N+6 个	ANC	O145 APC	O157 APC
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
STEC O145、O157 探针法 qPCR 引物-探针混合液干粉	各 5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 2.5 μL	不加	不加	不加
超纯水	各 2.5 μL	5 μL	2.5 μL	2.5 μL
STEC O145 血清型 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	2.5 μL	不加
STEC O157 血清型 阳性对照(1E4 拷贝/μL)	不加	不加	不加	2.5 μL

六、Probe PCR 反应（20 μL 体系）

6. 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℃	15 sec
	60℃	对 O26、O45、O103 三重 PCR，设置 60 sec（采集 FAM、VIC、ROX 三个通道的荧光信号，淬灭基团分别为 MGB） 对 O111、O121 双重 PCR，设置 60 sec（采集 FAM、VIC 两个通道的荧光信号，淬灭基团分别为 MGB） 对 O145、O157 双重 PCR，设置 60 sec（采集 FAM、VIC 两个通道的荧光信号，淬灭基团分别为 MGB）

七、数据处理

7. 如果 PPC 和 APC 结果均为阴性，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果 PNC 或 ANC 结果为阳性，说明环境污染，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系，购买新的引物和探针。

8. 如果阴性对照和阳性对照正常，则实验有效，可以进入后续分析。

9. 对定性检测，只判断阳性或阴性。

O26、O45、O103 结果判定		
FAM	Ct 值小于或等于 44	O26 血清型阳性
	Ct 值大于 44	O26 血清型阴性
VIC	Ct 值小于或等于 35	O45 血清型阳性
	Ct 值大于 35	O45 血清型阴性
ROX	Ct 值小于或等于 45	O103 血清型阳性
	Ct 值大于 45	O103 血清型阴性

O111、O121 结果判定		
FAM	Ct 值小于或等于 38	O111 血清型阳性
	Ct 值大于 38	O111 血清型阴性
VIC	Ct 值小于或等于 38	O121 血清型阳性
	Ct 值大于 38	O121 血清型阴性

O145、O157 结果判定		
FAM	Ct 值小于或等于 38	O145 血清型阳性
	Ct 值大于 38	O145 血清型阴性
VIC	Ct 值小于或等于 38	O157 血清型阳性
	Ct 值大于 38	O157 血清型阴性

关联产品	产志贺毒素大肠埃希氏菌染料法 qPCR 试剂盒