

五种致泻性大肠埃希氏菌核酸多重检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

使用说明书

(使用前请仔细阅读本说明书)

【产品名称】

通用名称: 五种致泻性大肠埃希氏菌核酸多重检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

英文名称: Multiplex PCR Detection Kit for Diarrheogenic Escherichia coli (Fluorescent Probe Assays)

【包装规格】 48 测试/盒

【产品编号】 FZ022BF2

【产品简介】

本试剂盒仅适用于食品中产志贺毒素(STEC)/肠道出血性(EHEC)、肠道致病性(EPEC)、肠道集聚性(EAEC)、肠道侵袭性(EIEC)、产肠毒素(ETEC)大肠埃希氏菌的毒力基因和类型判别的定性检测。

【检测原理】

基于 Real Time PCR 技术, 利用针对《GB4789.6-2016》中的 12 个毒力基因设计的引物、荧光探针以及其他反应优化配置所需试剂组合成 A、B、C 三管体系, 同时往三管体系加入待检样品即可进行扩增反应。在发生扩增过程中, 荧光探针与目的基因片段结合, 可被 Taq 酶分解并产生荧光信号, 此时荧光定量 PCR 仪可识别该荧光信号, 同时根据其强弱变化绘制出相应的实时扩增曲线, 进而判定大肠埃希氏菌的致泻类型。

A 管体系可用于 STEC/EHEC、EPEC 检测, B 管体系可用于 EAEC 检测和大肠埃希氏菌种属鉴定, C 管体系可用于 ETEC、EIEC 检测。

【产品组分】

组分名称	规格×数量
裂解液	1 mL×2 管
阳性对照	200 μL×1 管
阴性对照	200 μL×1 管
预混液 A	1 mL×1 管
预混液 B	1 mL×1 管
预混液 C	1 mL×1 管
说明书	1 份

【储存条件与保质期】

-20℃避光储存, 有效期为 12 个月, 避免反复冻融。冷冻条件下运输。

【灵敏度】

单通道最低检验限达到 100~500 cfu/Test。

【所需其他材料和适用仪器】

荧光定量 PCR 仪(具有能够检测 FAM、VIC、Cy5、ROX 标记的荧光通道)、高速离心机、移液器、移液枪头及离心管等。

【使用指南】

1. **样品前处理:** 参照 GB 4789.6-2016, 使用 1 μL 接种环刮取营养琼脂平板或斜面上培养 18 h~24 h 的待鉴定的可疑菌落, 悬浮到含 30 μL 裂解液或者无菌水的 0.2 mL 无菌离心管中, 充分悬浮菌体, 轻弹管壁消除气泡, 99℃加热 10 min; 12000 r/min 离心 15 min, 上清即为粗提的 DNA, 可转移至 0.2 mL 无菌离心管中, 在-20℃下可长期保存。也可以选择商业化的细菌基因组提取试剂盒进行提取。

2. 加样、反应

1) 按照需求取 n 个 PCR 反应管 (n=1 管阴性对照+待检测样品数+1 管阳性对照), 从试剂盒中取出预混液, 充分融化, 涡旋后短暂离心, 以上每管加入 20 μL 预混液, 待用。

2) 向上述 n 个反应管中分别加入阴性对照、待测样品 DNA、阳性对照各 5 μL, 总反应体积为 25 μL。盖紧管盖, 短暂离心, 立即进行 PCR 扩增反应。

3) PCR 反应体系为 25 μL, 取 FAM、VIC、Cy5、ROX 检测通道, 在反应阶段 2 中 59℃时收集荧光信号, 具体程序如下:

反应阶段	温度	时间	信号收集	循环数
1	95℃	1 min		1
2	95℃	10 sec	√	40
	59℃	40 sec		

注: 在反应阶段 2 中 59℃时收集荧光信

号，对于多通道荧光 PCR 仪，取荧光素“FAM”、“VIC”、“Cy5”、“ROX”为信号采集通道，淬灭基团选择“None”，染料校正选择“None”。

3. 结果

一般情况下，可通过软件自动设定的基线、阈值等直接读取检测结果。如需调整，可根据所使用仪器的自身情况（如噪声等）以及选取的不同荧光通道进行调整。

1) 质量控制：

阴性对照未出现明显的 S 型扩增曲线或 Ct 值 >37，阳性对照出现 S 型扩增曲线且其 Ct 值 <25。若阴阳性对照不同时满足上述条件，则本次检测结果无效，应重新检测或与产品技术支持联系。

2) 结果判读：

根据反应所得 Ct 值判读，具体见下表：

Ct 值	每个基因判读结果
≤30	对应的基因阳性。
30~37	建议重新检测，若复测结果 Ct≥37，则对应的基因阴性；若重做结果 Ct<37，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性；
≥37	对应的基因阴性。

各致病型阳性判别标准：

	通道	基因	结果判读
A 管	FAM	stx2	escV(+/-)、bfpB(-)、stx1 和 stx2 至少一个为阳性判为 STEC/EHEC； escV(+)、bfpB(+/-)、stx1(-)、stx2(-)判为 EPEC。
	VIC	stx1	
	CY5	bfpB	
	ROX	escV	
B 管	FAM	aggR	aggR、astA、pic 中一个或者一个以上阳性判为 EAEC； 当只有 uidA(+)，其他 11 个检测目标为阴性时，判为非致泻性大肠埃希氏菌。
	VIC	aggR	
	CY5	pic	
	ROX	uidA	
C 管	FAM	stp	invE(+) 判为 EIEC； stp、sth、It 至少一个阳性
	VIC	sth	

CY5	invE	判为 ETEC。
ROX	It	

- ❖ astA 和 pic 基因可在细菌间转移，当与其他 DEC 毒力基因检测结果同时阳性时，则 astA 和 pic 基因不作为型别判定依据。
- ❖ stp 基因灵敏度稍低，为保证检测结果，检测样品的 DNA 浓度高一点为好。
- ❖ 一般猪源的 ST 基因和人源的 ST 基因在分离的菌株中只存在其中一种，特殊情况下除外。
- ❖ 多重 qPCR 检测可能出现不同荧光通道之间竞争抑制的问题，单基因分析时适当调整阈值线。

【注意事项】

1. 实验环境条件和过程控制应参照 GB/T 27403《实验室质量控制规范食品分子生物学检测》规定执行。
2. 使用本试剂盒前请仔细阅读本说明书全文，检测过程中建议穿洁净工作服，戴一次性手套，使用的移液枪头需提前灭菌。
3. 试剂盒中试剂使用前需充分融化、混匀，短暂离心后使用，期间需尽量避免产生气泡，加样完毕后检查反应管是否盖紧，避免泄露造成污染。
4. 待检测样品基因变异可能会造成假阴性结果；待检测样品交叉污染、实验室环境污染以及试剂污染均会造成假阳性结果。
5. 不同批号的产品请勿混合使用，请在产品有效期内使用试剂盒，由于操作不当引起的误判，以及由此误判引发的其他事项，本公司概不负责。
6. 检测完毕后，根据相关规定正确处理废弃耗材以及扩增产物。

【生产企业】

企业名称：广东环凯生物科技有限公司
 生产地址：广东省肇庆市高新区科技大街中 13 号
 邮政编码：526238
 技术热线：020-32078333-8877
 企业网址：<http://www.bhkbio.com>
 E-mail：Webmaster@huankai.com

【说明书修改时间】

2023 年 05 月 11 日

