



## 五种致泻大肠埃希氏菌多重 PCR 检测试剂盒说明书

### 【产品名称】

通用名称: 五种致泻大肠埃希氏菌多重PCR 检测试剂盒

英文名称: Multiplex PCR Diagnostic Kit for Rapid Identification of Diarrheogenic *Escherichia coli*

【产品货号】MX-2101

【包装规格】24 次反应/盒

【用途】本试剂盒用于 EAEC、EPEC、STEC/EHEC、ETEC、EIEC 五种致泻大肠埃希氏菌核酸的体外检测, 实验结果仅为基础研究提供参考, 不作为临床诊断依据。

### 【运输及保存】

1. 运输: 常温或冷藏运输
2. 保存: 2°C-8°C 冷藏保存 (长期不用时建议 -20°C 保存)
3. 有效期: 24 个月

### 【检验原理】

本试剂盒采用多重 PCR 技术, 适用于五种致泻大肠埃希氏菌 (EPEC、EHEC、ETEC、EIEC、EAEC) 核酸的体外检测。每个反应体系均含有大肠埃希氏菌种属鉴定和毒力基因检测的十二对特异性引物, 根据 PCR 扩增产物的条带大小来判定菌株中含有的毒力基因种类并确定其致病型别。

### 【试剂盒内容】

序号	产品组成	规格
1	PCR 冻干粉	24 次反应/管
2	RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	1mL/管×1
3	裂解液	5mL/瓶×1
4	空白PCR管	8 管/排×3

### 【操作步骤】

#### 1. 样本制备:

方法①: 参照 GB 4789.6-2016 致泻大肠埃希氏菌检验中 6.5.2 中所述制备;

方法②: 按照本说明书进行制备, 方法如下:

a) 增菌液检测: 取增菌液 1mL 于 1.5mL 离心管中, 3000×g 离心 10min 或 10000×g 离心 2min, 弃去上清, 加入 200μL 裂解液, 涡旋混匀, 金属浴 99°C 或沸水浴裂解 10min, 冰浴冷却后 12000×g 离心 2min, 取上清即为模板。

b) 菌落检测: 用接种环取一环菌落, 溶于 200μL 裂解液中, 涡旋混匀, 金属浴 99°C 或沸水浴裂解 10min, 冰浴冷却后 12000×g 离心 2min, 取上清即为模板。

#### 2. 反应体系配制

①从试剂盒中取出 PCR 冻干粉每管加入 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 575μL, 震荡混匀。(如一次用量较少, 可分装到离心管中 -20°C 保存)

②取步骤 2 ①中的 23μL 反应体系加入到空白 PCR 管中。

③取步骤【样本制备】中提取的 2μL DNA 样品加入到 PCR 管中, 总反应体积为 25μL。

④阳性对照、阴性对照和空白对照体系分别加入相应的阳性对照、阴性对照和 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 2μL。

#### 3. 反应条件

预变性 95°C 5min; 变性 95°C 30s, 复性 63°C 30s, 延伸 72°C 1.5min, 40 个循环; 72°C 延伸 10min。将配制完成的 PCR 反应管放入 PCR 仪中, 核查 PCR 反应条件正确后, 启动反应程序。

### 【结果分析与判定】

地址: 北京市朝阳区高碑店北路甲3号(100123) 电话: +86-10-51203999 传真: +86-10-51349510 技术支持电话: +86-10-85786931

E-mail: info@beijinglandbridge.com luqiaotech@hotmail.com 免费服务热线: 800-810-1304 400-810-1304

山东分公司: 电话: +86-532-82689263 传真: +86-532-82689273 广东分公司: 电话: +86-20-38011430 传真: +86-20-38011431

东北办事处: 电话: +86-451-87821139 传真: +86-451-87821139



1. 对PCR扩增产物进行电泳分析：若选用琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行分离鉴定，推荐使用浓度为2%的琼脂糖凝胶，且胶的长度不小于10cm；建议电压值设定为电泳槽正负极距离(cm)与5(V/cm)的乘积，电泳时间一般为30-45min；推荐使用条带大小间隔100bp的 DNA Marker，同时可用阳性对照的PCR产物作为特异性分子Marker。

2. 结果判定：>97%的大肠埃希氏菌（包括致泻和非致泻大肠）有*uidA*(1487bp)的扩增条带。在*uidA*条带的基础上，若有毒力基因条带的扩增，则为致泻大肠埃希氏菌。根据100bp DNA Marker和（或）阳性对照判断扩增条带大小，进而确定毒力基因种类，结合毒力基因组合方式判定最终致病型别，具体组合方式见下表。

致病型别	目标条带大小及阳性判定结果组合	
EAEC	<i>astA</i> (102bp) <i>aggR</i> (400bp) <i>pic</i> (1111bp)	<i>astA</i> , <i>aggR</i> , <i>pic</i> 中一条或一条以上阳性
EPEC	<i>escV</i> (544bp) <i>bfpB</i> (910bp)	<i>bfpB</i> (+/-), <i>escV</i> (+), <i>stx1</i> (-), <i>stx2</i> (-)
STEC/EHEC	<i>escV</i> (544bp) <i>stx1</i> (244bp) <i>stx2</i> (324bp)	<i>escV</i> (+/-), <i>stx1</i> (+), <i>stx2</i> (-), <i>bfpB</i> (-); <i>escV</i> (+/-), <i>stx1</i> (-), <i>stx2</i> (+), <i>bfpB</i> (-); <i>escV</i> (+/-), <i>stx1</i> (+), <i>stx2</i> (+), <i>bfpB</i> (-)
ETEC	<i>lt</i> (655bp) <i>stp</i> (157bp) <i>sth</i> (171bp)	<i>lt</i> , <i>stp</i> , <i>sth</i> 中一条或一条以上阳性
EIEC	<i>invE</i> (766bp)	<i>invE</i> (+)

\**astA*、*pic*基因可在细菌间转移，当与其他毒力基因同时为阳性时，*astA*、*pic*基因不作为型别判定依据，如检测*uidA*、*invE*、*pic*同时阳性，则判定该菌株为EIEC；如检测*uidA*、*lt*、*astA*同时阳性，则判定该菌株为ETEC。

#### 【检测方法的局限性】

本试剂盒检测的靶序列为致泻大肠埃希氏菌基因的保守区域，这些基因高度保守稳定。如果细菌在靶序列处发生基因突变，则可能出现假阴性结果，即发生漏检；同时，样品收集、处理、运送和保存的质量均会对检测结果造成影响。鉴于毒力基因可在细菌间转移，实际检测中可存在一株菌中同时含有源自不同型别的致泻大肠埃希氏菌毒力基因的可能性。

#### 【注意事项】

1. 实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按操作步骤执行。
2. 试剂盒内各组分在使用前应充分融化混匀并经高速短暂离心后使用。
3. 试剂盒必须避光保存，所使用的离心管、Tip头应高压灭菌，且不含DNase和RNase。整个操作过程和PCR实验室的软硬件设施应符合卫计委颁发《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》、《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》等法规的要求。并恰当处理试验过程中产生的废物和扩增产物，防止交叉污染。

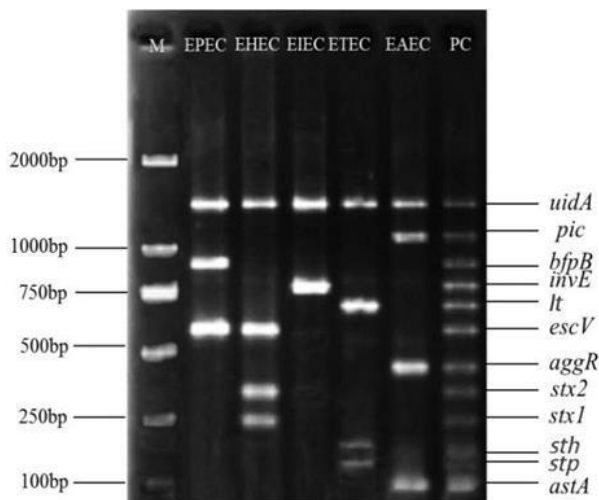


图 五种致泻大肠埃希氏菌与阳性对照电泳图  
\*M表示2000bp DNA Marker，PC表示12重阳性对照，图中五种致泻大肠埃希氏菌型别携带有典型毒力基因。

本产品仅适用于实验室的工业、科研目的，不用于临床诊断或治疗。