



五种致泻大肠埃希氏菌多重实时荧光 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实时荧光PCR检测试剂盒

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

【产品货号】MX-2102

【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】

本试剂盒采用多重实时荧光PCR技术, 适用于五种致泻大肠埃希氏菌(EPEC、STEC/EHEC、ETEC、EIEC、EAEC)核酸的体外检测。整体反应体系中含有大肠埃希氏菌种属鉴定和毒力基因检测的11对特异性引物探针, 根据荧光PCR扩增产物的CT值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(A、B、C、D)	24次反应/管×4
2	RNase-Free ddH ₂ O	5mL/管×1
3	裂解液	5mL/瓶×1
4	空白PCR管	8管/排×12

【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 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200uL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, 建议稀释至约100ng/uL。

2. 反应体系配制

- ①从试剂盒中取出试剂到室温, 每管加入RNase-Free ddH₂O 598μL, 震荡混匀。
- ②取步骤2①中的23μL反应体系加入到PCR管中。
- ③取步骤1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 ddH₂O 2μL。

3. 反应条件



阶段	循环数	温度	时间	步骤	荧光信号 [#] 采集
预变性	1	95°C	5 min	预变性	否
Real-time PCR	40	95°C	5 sec	变性	否
		60°C	30-60 sec*	退火	是

*: 使用不同型号仪器进行时间设定时, 请按照仪器使用说明书要求进行实验操作, 一般设定在34 sec。

[#]: 五种致泻大肠埃希氏菌特异性基因、毒力基因荧光基团、淬灭基团见下表。

荧光基团	A	B	C	D	淬灭基团
FAM	<i>aggR</i>	<i>stx1</i>	<i>lt</i>	<i>sth</i>	TAMRA
VIC	<i>pic</i>	<i>stx2</i>	<i>stp</i>	<i>ipaH</i>	TAMRA
CY5	<i>escV</i>	<i>uidA</i>	<i>bfpB</i>		TAMRA

【结果分析与判定】

空白对照: 无FAM、VIC、CY5荧光信号检出, 未出现典型的扩增曲线。

阴性对照: 无FAM、VIC、CY5荧光信号检出, 未出现典型的扩增曲线。

阳性对照(含致病基因): 有FAM、VIC、CY5荧光信号检出, 出现典型的扩增曲线, Ct值<30.0。

以上需同时满足, 否则本次实验无效。

样品检测结果:

Ct值≥35, 判定结果为阴性;

Ct值<30, 并出现典型的扩增曲线, 判断样品为阳性;

30≤Ct值<35, 并且出现典型的扩增曲线, 则重新提取DNA检测。再次检测结果仍为30≤Ct值<35, 则判定样品为阳性; Ct值≥35, 判定结果为阴性。

致病型别	目标基因阳性判定结果组合	
EAEC	<i>astA</i> , <i>aggR</i> , <i>pic</i> 中一条或一条以上阳性	
EPEC	<i>bfpB</i> (+/-), <i>escV</i> (+), <i>stx1</i> (-), <i>stx2</i> (-)	
STEC/EHEC	<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> , <i>stp</i> , <i>sth</i> 中一条或一条以上阳性	
EIEC	<i>invE</i> (+) 或 <i>ipaH</i> (+)	

【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。

【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。
4. 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。