

旋达®R1 致病微生物系列

致泻大肠埃希氏菌鉴定试剂盒（PCR 法）

请于-20℃条件下保存，有效期 12 个月

◆ 产品说明

旋达®R1 病菌检测系列可针对食品、饲料等样品中的致病微生物的特异核酸片段进行扩增，仪器实时监测扩增过程中的荧光信号变化，自动判读结果。本产品用于致泻大肠埃希氏菌的检测。检出限为 10^3 CFU/ml。

◆ 产品组成（96 测试）

	试剂	含量	作用
孔 1	反应液-uidA		内参
孔 2	反应液-ipaH		鉴定 EIEC
孔 3	反应液-pic		鉴定 EAEC
孔 4	反应液-aggR	23μl/孔	鉴定 EAEC
孔 5	反应液-astA	12 孔/排	鉴定 EAEC
孔 6	反应液-stx1	8 排	鉴定 EPEC 与 EHEC
孔 7	反应液-stx2	（本产品使用 12 联	鉴定 EPEC 与 EHEC
孔 8	反应液-bfpB	PCR 管分装，每排含	鉴定 EPEC 与 EHEC
孔 9	反应液-escV ^a	12 种反应液各 23ul）	鉴定 EPEC 与 EHEC
孔 10	反应液-lt		鉴定 ETEC
孔 11	反应液-stp		鉴定 ETEC
孔 12	反应液-sth		鉴定 ETEC
	NG-Ecoli	100μL × 1 支	阴性对照
	NG-DW	100μL × 1 支	空白对照
	PG-Ecoli	100μL × 1 支	阳性对照
	Loading Buffer	600μL×1 支	电泳上样缓冲液

◆ 所需仪器

ABI，BioRad，TaKaRa 等 PCR 扩增仪，电泳仪，凝胶成像仪等电泳配套设备。（使用荧光定量 PCR 仪进行定性判读时则无需电泳设备）

◆ 自备耗材和仪器

①灭菌 1.5mL 或 2.0mL 离心管；②冰盒；③移液器（0.5-10μL，10-100μL，100-1000μL）及配套灭菌吸头；④离心机；⑤涡旋混匀器；⑥金属浴。

◆ 样品处理

参照《GB4789.6—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》中的操作步骤进行前增菌。建议使用试剂配套细菌基因组 DNA 提取系列产品。

◆ 实验操作

1. 添加模板（样本制备区，放置于冰盒中进行）

取所待检样品数+3 的 12 联反应管，将试剂完全解冻，分离心 30s。离心后揭开封口膜，使用穿刺加样法穿过固封层向每管反应液中分别加入 2μL 模板（或直接使用无菌吸头挑取少许待检菌落至反应管中）。

加样示例：（有 2 个待测样品）

取 5 排 12 联反应管，按顺序第一排全部加 NG-DW，第二排全部加 NG-Ecoli，第三排全部加样品 1，第四排全

部加样品 2，第五排全部加 PG-Ecoli。

盖好配套的 PCR 管盖后，涡旋混匀 30s，离心 1min，立即进行 PCR 扩增反应。

2. 扩增反应（扩增及产物分析区）

按下列条件设置扩增反应：（如需使用荧光法进行检测请选择 FAM 通道）

PCR 循环			荧光收集位点
95℃	10 分钟	1 个循环	—
95℃	30 秒	30 个循环	—
63℃	30 秒		—
72℃	90 秒		※
72℃	5 分钟	1 个循环	—

3. 产物电泳（扩增及产物分析区）

称量 4.0g 琼脂糖粉，加入至 200 mL 的 1×TAE 电泳缓冲液中，充分混匀。使用微波炉反复加热至沸腾，直到琼脂糖粉完全融化形成清亮透明的溶液。待琼脂糖溶液冷却至 60℃左右时，加入溴化乙锭(EB)至终浓度为 0.5μg/mL，充分混匀后，轻轻倒入已放置好梳子的模具中，凝胶长度要大于 10cm，厚度宜为 3mm~5mm。检查梳齿下或梳齿间有无气泡，用一次性吸头小心排掉琼脂糖凝胶中的气泡。当琼脂糖凝胶完全凝结硬化后，轻轻拔出梳子，小心将胶块和胶床放入电泳槽中，样品孔放置在阴极端。向电泳槽中加入 1×TAE 电泳缓冲液，液面高于胶面 1mm~2mm。将 5μL PCR 产物与 1μL 6×上样缓冲液混匀后，用微量移液器吸取混合液垂直伸入液面下胶孔，小心上样于孔中；阳性对照的 PCR 反应产物加入到最后一个泳道；第一个泳道中加入 2 μL 分子量 Marker。接通电泳仪电源，根据公式：电压=电泳槽正负极间的距离（cm）×5V/cm 计算并设定电泳仪电压数值；启动电压开关，电泳开始以正负极铂金丝出现气泡为准。电泳 30min~45min 后，切断电源。取出凝胶放入凝胶成像仪中观察结果，拍照并记录数据。

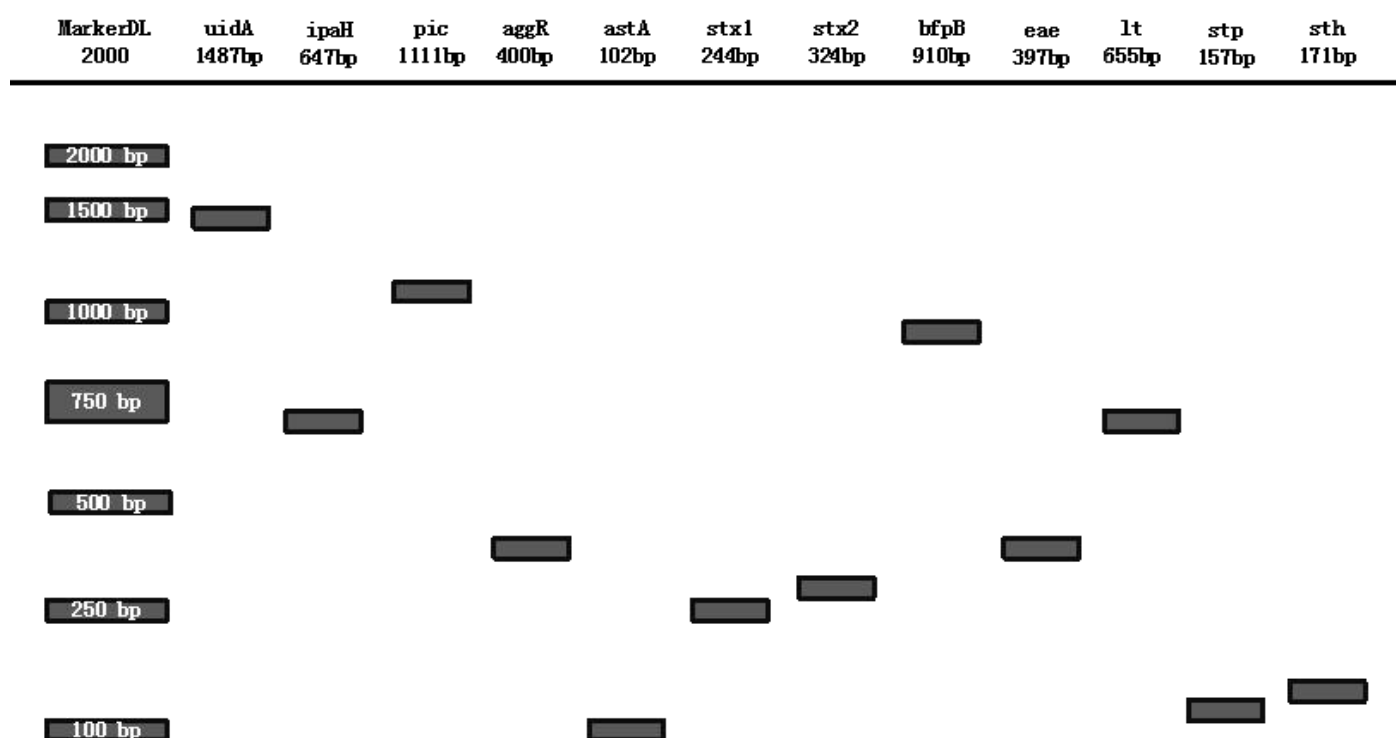
◆ 可使用 Gold view、Gal-Rad 等等效的核酸荧光染料替代 EB。

◆ 推荐使用 DNA Marker：DL2000 或 100bp ladder，等可指示 100bp~1500bp 条带的 Marker。

◆ 结果分析

1. 阴阳性判读：

进行电泳检测时，需对比 Marker 进行判断，当目的靶标对应位置出现单一显著条带时可判断该靶标为阳性；否则为该靶标检测为阴性。（使用荧光定量 PCR 仪检测时，检测孔 Ct≤30 时判断该孔为阳性；当检测孔 Ct>30 时，该检测孔为阴性）



示例电泳图

2. 有效性判读：

需同时满足：1.空白对照中所有泳道均为阴性；2.阴性对照中 uidA 泳道阳性，其余泳道阴性；3.阳性对照中所有泳道阳性，此时可判断实验有效。如无法满足上述条件，则实验无效，需重复实验；如重复后结果仍为无效，请于本公司技术支持联系。

3. 结果判读：

在实验有效的情况下，可根据下表进行判读：

致泻大肠埃希氏菌类别	目标条带的种类组合	
EIEC	<i>ipaH</i> (+)	<i>uidA</i> (+ / -)
EAEC	<i>aggR</i> , <i>astA</i> , <i>pic</i> 中一条或一条以上阳性	
EPEC	<i>bfpB</i> (+ / -), <i>eae</i> (+), <i>stx1</i> (-) <i>stx2</i> , (-)	
STEC/EHEC	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> 中一条或一条以上阳性, <i>eae</i> (+ / -), <i>bfpB</i> (-)	
ETEC	<i>lt</i> , <i>stx</i> , <i>stx</i> 中一条或以上阳性	

- ◆ 97%以上大肠埃希氏菌为 *uidA* 阳性，可参考阴性对照中该基因检测结果判断扩增效果；
- ◆ 当结果判定为 EPEC 阳性时，若 *bfpB* 靶标为阳性则说明样品含有典型 EPEC；若 *bfpB* 靶标为阴性则说明样品为非典型 EPEC；
- ◆ 当结果判定为 STEC/EHEC 阳性时，若 *eae* 靶标为阳性则说明样品含有典型 EHEC；若 *eae* 靶标为阴性则说明样品为非典型 EHEC。

◆ 注意事项

1. 本试剂检测灵敏度高。为了防止污染，实验要分区操作。
 - 1) 第一区：样本制备区。
 - 2) 第二区：扩增及产物分析区。

★ 分区之间最好进行物理性隔离，避免人为因素造成的污染。
2. 实验过程中穿戴工作服和乳胶手套，使用移液器，试验产生的所有废弃物及时处理。
3. 严格按照操作步骤操作，试剂配制和加样等步骤请严格按照说明书要求在冰盒上操作。
4. 反应液中的成分对光敏感，应**避光保存**。试剂使用前要完全解冻，但应避免反复冻融，推荐使用前离心 30 秒。
5. 不同批号试剂请勿混合使用，在有效期内使用。

◆ 企业信息

广州双螺旋基因技术有限公司 网址：www.dhelix.cn
电话：020-85671013 传真：020-34037175
地址：广州国际生物岛螺旋四路 7 号标准产业单元二期第三栋第三层 302 单元