

旋达[®]R1 致病微生物系列

五种致泻性大肠埃希氏菌鉴定试剂盒（PCR 法）

请于-20℃条件下保存, 有效期 15 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。本产品用于致泻大肠埃希氏菌的检测。检出限为 10³ CFU/ml。

◆ 产品组成（96 测试）

	试剂	含量	作用
管 1	反应液-uidA	200μL × 1 支	内参
管 2	反应液-ipaH	200μL × 1 支	鉴定 EIEC
管 3	反应液-pic	200μL × 1 支	鉴定 EAEC
管 4	反应液-aggR	200μL × 1 支	鉴定 EAEC
管 5	反应液-astA	200μL × 1 支	鉴定 EAEC
管 6	反应液-stx1	200μL × 1 支	鉴定 EPEC 与 EHEC
管 7	反应液-stx2	200μL × 1 支	鉴定 EPEC 与 EHEC
管 8	反应液-bfpB	200μL × 1 支	鉴定 EPEC 与 EHEC
管 9	反应液-escV	200μL × 1 支	鉴定 EPEC 与 EHEC
管 10	反应液-lt	200μL × 1 支	鉴定 ETEC
管 11	反应液-stp	200μL × 1 支	鉴定 ETEC
管 12	反应液-sth	200μL × 1 支	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

◆ 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。

◆ 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《GB 4789.6—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. 试剂配制（试剂配制区，放置于冰盒中进行）

取出各管试剂，将试剂完全解冻，离心 30s。取 12×(所待检样品数+3)的 PCR 反应管，按 12 个一组排列并编号，依次向各管中加入 23μL 的 12 种反应液。

2. 添加模板（样本制备区，放置于冰盒中进行）

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 N 个待测样品）

取(N+3)组 12 个一组的反应管，按顺序第一组 12 管中全部加入 2μL 的 NG-DW，第二组 12 管中全部加入 2μL 的 NG-Ecoli，第三组 12 管中全部加入 2μL 的样品 1 模板，第四组 12 管中全部加入 2μL 的样品 2 模板，…，最后一组 12 管中全部加入 2μL 的 PG-Ecoli。

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

3. 扩增反应（扩增及产物分析区）

按下列条件设置扩增反应：

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

4. 产物电泳（扩增及产物分析区）

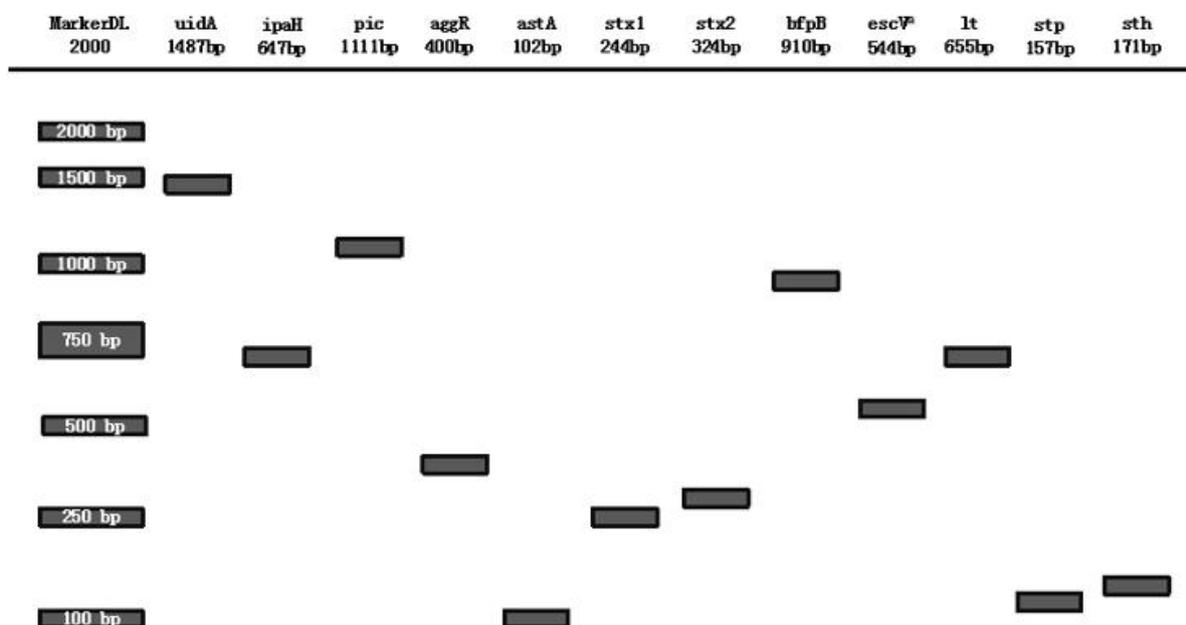
称量 4.0g 琼脂糖粉，加入至 200 mL 的 1×TAE 电泳缓冲液中，充分混匀。使用微波炉反复加热至沸腾，直到琼脂糖粉完全融化形成清亮透明的溶液。待琼脂糖溶液冷却至 60°C 左右时，加入溴化乙锭 (EB) 至终浓度为 0.5μg/mL，充分混匀后，轻轻倒入已放置好梳子的模具中，凝胶长度要大于 10cm，厚度宜为 3mm~5mm。检查梳齿下或梳齿间有无气泡，用一次性吸头小心排掉琼脂糖凝胶中的气泡。当琼脂糖凝胶完全凝结硬化后，轻轻拔出梳子，小心将胶块和胶床放入电泳槽中，样品孔放置在阴极端。向电泳槽中加入 1×TAE 电泳缓冲液，液面高于胶面 1mm~2mm。用微量移液器吸取 3-4μL PCR 反应产物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。



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；2.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> (+)	
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>escV</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>escV</i> (+ / -), <i>bfpB</i> (-)	
ETEC	<i>lt</i> , <i>stp</i> , <i>sth</i> 中一条或以上阳性	
		<i>uidA</i> (+ / -)

- ◆ 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 *escV* 靶标为阳性则说明样品含有典型 EHEC；若 *escV* 靶标为阴性则说明样品为非典型 EHEC。

◆ 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