

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:13-39500  
低温运输, -20°C保存

**BINGENE**

## 致泻性大肠杆菌通用 PCR 试剂盒

*Diarrheagenic E coli* PCR Kit

**使用手册 V1.0**

北京天恩泽基因科技有限公司

网址 : [www.bingene.com](http://www.bingene.com) ; 电话 : 400-6005850 ; 电邮 : [order@bingene.com](mailto:order@bingene.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>能够引起肠道内急性腹泻的大肠杆菌统称为致泻性大肠杆菌 ( Diarrheagenic Escherichia coli , DEC ) 根据致病性的不同, 致泻性大肠埃希菌被分为五种, 即肠致病性大肠埃希氏菌(EPEC)、肠产肠毒素大肠埃希氏菌(ETEC)、肠侵袭性大肠埃希氏菌(EIEC)、肠出血性大肠埃希氏菌(EHEC)和粘附性肠埃希氏菌(EAEC)。我国发生的食物中毒事件中, 细菌性食物中毒的人数最多, 占总中毒人数的 42.8%, 其中致泻性大肠埃希氏菌是引起人体以腹泻症状为主的全球性疾病的常见病原菌, 在我国引起感染性腹泻的发病率居所有传染病之首, 因此快速灵敏检测致泻性大肠杆菌具有重要意义。本产品是根据 PCR 原理开发的致泻性大肠杆菌通用检测试剂盒, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 即开即用, 用户只需要提供样品 DNA 模板。</li> <li>2. 产品经过精心优化, 分析灵敏性能到达 E3 拷贝/反应。</li> <li>3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。</li> <li>4. 特异性高, 引物是根据致泻性大肠杆菌 DNA 高度保守区设计, <i>in silico</i> 分析发现它只能检测致泻性大肠杆菌, 不会跟除此之外的其他细菌的 DNA 发生交叉反应。</li> <li>5. 本产品足够 50 次 20<math>\mu</math>L 体系的常规 PCR 反应。</li> <li>6. 本产品只能用于定性实验, 不能用于定量实验。</li> <li>7. 本产品只能用于科研。</li> </ol>																	
<p><b>规格及成分</b></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成 份</th> <th>编 号</th> <th>五孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PCR MagicMix 3.0</td> <td>90805</td> <td>500<math>\mu</math>L ( 红盖 )</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>100935</td> <td>1mL ( 紫盖 )</td> </tr> <tr> <td>致泻性大肠杆菌 PCR 引物混合液</td> <td>yw13-39500</td> <td>100<math>\mu</math>L ( 白盖 )</td> </tr> <tr> <td>致泻性大肠杆菌 PCR 阳性对照 ( 1<math>\times</math>10<sup>7</sup> 拷贝/<math>\mu</math>L )</td> <td>pc39500</td> <td>50<math>\mu</math>L ( 黄盖 )</td> </tr> </tbody> </table>	成 份	编 号	五孔盒包装	PCR MagicMix 3.0	90805	500 $\mu$ L ( 红盖 )	超纯水	100935	1mL ( 紫盖 )	致泻性大肠杆菌 PCR 引物混合液	yw13-39500	100 $\mu$ L ( 白盖 )	致泻性大肠杆菌 PCR 阳性对照 ( 1 $\times$ 10 <sup>7</sup> 拷贝/ $\mu$ L )	pc39500	50 $\mu$ L ( 黄盖 )		
成 份	编 号	五孔盒包装																
PCR MagicMix 3.0	90805	500 $\mu$ L ( 红盖 )																
超纯水	100935	1mL ( 紫盖 )																
致泻性大肠杆菌 PCR 引物混合液	yw13-39500	100 $\mu$ L ( 白盖 )																
致泻性大肠杆菌 PCR 阳性对照 ( 1 $\times$ 10 <sup>7</sup> 拷贝/ $\mu$ L )	pc39500	50 $\mu$ L ( 黄盖 )																

	使用手册	13-39500sc	1份																
	注：为避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供专一的 DNA 片段作为阳性对照。																		
<b>运输及保存</b>	低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。																		
<b>自备试剂</b>	样品 DNA																		
<b>使用方法</b>	<p><b>一、样品 DNA 的制备</b></p> <p>1. 如果有 N 个病毒样品，必须设置 N+2 个提取反应，多出的两个中一个是 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10μL 致泻性大肠杆菌 PCR 阳性对照（1×10E7 拷贝/μL，本试剂盒提供）再加上一定量的水作为制备的阳性对照（加水后其总体积跟样品一样，样品体积多少取决于所用试剂盒的要求）。可以用水作为制备的阴性对照。</p> <p>2. 用自选方法纯化上述 N+2 个样品的 DNA。本试剂盒跟市场上大多数细菌 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选用本公司的细菌核酸提取试剂盒或免提取核酸释放剂。</p> <p><b>二、设置 PCR 反应（20μL 体系）</b></p> <p>3. 标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 DNA 样品，额外增加的两个管一个用于 PCR 阳性对照，另一个用于 PCR 阴性对照。按照下表在各 PCR 管中加入下列成分：</p> <table border="1" data-bbox="470 1691 1455 2107"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>N+2 个 样品管</th> <th>PCR 阴性 对照</th> <th>PCR 阳性 对照</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PCR MagicMix 3.0</td> <td>各 10μL</td> <td>10μL</td> <td>10μL</td> </tr> <tr> <td>致泻性大肠杆菌 PCR 引物混合液</td> <td>各 2μL</td> <td>2μL</td> <td>2μL</td> </tr> <tr> <td>制备的 N+2 个 DNA 样品</td> <td>各 8μL</td> <td>不加</td> <td>不加</td> </tr> </tbody> </table>			成份	N+2 个 样品管	PCR 阴性 对照	PCR 阳性 对照	PCR MagicMix 3.0	各 10μL	10μL	10μL	致泻性大肠杆菌 PCR 引物混合液	各 2μL	2μL	2μL	制备的 N+2 个 DNA 样品	各 8μL	不加	不加
成份	N+2 个 样品管	PCR 阴性 对照	PCR 阳性 对照																
PCR MagicMix 3.0	各 10μL	10μL	10μL																
致泻性大肠杆菌 PCR 引物混合液	各 2μL	2μL	2μL																
制备的 N+2 个 DNA 样品	各 8μL	不加	不加																

超纯水	不加	8 $\mu$ L	不加
致泻性大肠杆菌 PCR 阳性对照 的 10 倍稀释液	不加	不加	8 $\mu$ L

4. 上机进行 PCR，PCR 反应参数为:

过程	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}$ C	5 分钟
PCR 反应 ( 35 个循环 )	95 $^{\circ}$ C	20 秒
	55 $^{\circ}$ C	20 秒
	72 $^{\circ}$ C	40 秒
延伸	72 $^{\circ}$ C	10 分钟

### 三、电泳分析

- 取 5-10 $\mu$ L 扩增产物进行常规琼脂糖电泳，检测扩增效果，由于扩增产物较短，建议用 1.5%-2.0%的琼脂糖凝胶。
- 阳性样品预期得到的扩增产物长度为 208bp。如果两个阴性对照（样品制备阴性对照或 PCR 阴性对照）有此扩增产物，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析实验结果。
- 如果所有样品和 PCR 阳性对照均无此扩增产物，则说明有系统性的问题（试剂，设备，程序，操作等），需要重复并排查原因。
- 如果没有上述两种情况，则实验有效，可以分析样品的扩增结果。N+2 个样品中扩增产物的判断为阳性，无则判定为阴性。

### 关联产品

致泻性大肠杆菌通用 PCR 试剂盒