|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:13-39580****低温运输，-20℃保存** |  |
| **禽致病性大肠杆菌O1血清型PCR试剂盒****Avian Pathogenicity *Escherichia coli* PCR Kit** |
| **使用手册V1.0** |
| **江苏天净沙基因诊断技术有限公司****网址：www.bingene.com；电话：400-6005850；电邮：order@bingene.com** |
| **产品及特点** | 禽致病性大肠杆菌O1血清型（Avian Pathogenic *Escherichia coli*，APEC）会引发鸡大肠杆菌败血症，尤其在冬季发病率高，死淘率通常在5%-20%，严重的可达50%，雏鸡在夏季也较多发，病鸡精神不振，采食减少，衰弱和死亡，病鸡腹部膨满，排出黄绿色的稀便，特征性的病变是纤维素性心包炎，气囊混浊肥厚，有干酪样渗出物，肝包膜呈白色混浊，有纤维素性附着物，有时可见白色坏死斑，脾充血肿胀，给养殖业带来较大的经济损失，因此禽致病性大肠杆菌O1血清型的快速检测具有重要的意义。本试剂盒根据PCR原理开发，它具有下列特点：1. 即开即用，用户只需要提供样品DNA模板。
2. 产品经过精心优化，分析灵敏性能到达1000拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据禽致病性大肠杆菌O1血清型DNA高度保守区设计，in silico分析发现它只能检测禽致病性大肠杆菌O1血清型，不会跟除此之外的其他生物的DNA发生交叉反应。
5. 本产品足够50次20μL体系的常规PCR反应。
6. 本产品只能用于定性实验，不能用于定量实验。
7. 本产品只能用于科研。
 |
| **规格及成分** | 本产品使用五孔盒包装

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 成份 | 编号 | 规格 | 包装 |
| 2×PCR MasterMix（电泳法） | 990805 | 0.5 mL | 0.5 mL本色管 |
| 超纯水 | 210806 | 1 mL | 1.5 mL蓝盖管 |
| 禽致病性大肠杆菌O1血清型PCR引物混合液 | yw13-63500 | 100 μL | 0.5 mL白盖管 |
| 禽致病性大肠杆菌O1血清型PCR阳性对照(1×10E4拷贝/μL) | pc63500-GU299791 | 250 μL | 0.5 mL黄盖管 |
| 使用手册 | 13-63500sc | 1份 |  |

 |
| **运输及保存** | 低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。 |
| **自备试剂** | 样品DNA。 |
| **使用方法** | **一、样品DNA的制备**1. 如果有N个样品，必须设置N+2个提取，多出的一个是PC（样品制备阳性对照），一个是NC（样品制备阴性对照）。可以用10uL本试剂盒提供的PCR阳性对照（1×10E4拷贝/μL）加水作为核酸制备的阳性对照，加水后其体积必须跟核酸制备试剂盒所要求的起始样本体积一致。直接用水作为核酸制备的阴性对照。
2. 用自选方法纯化样品的DNA，本试剂盒跟市场上大多数细菌DNA提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的相关产品或免提取的核酸释放剂。

**二、设置PCR反应（20 μL体系）**1. 对N+2个样品，在PCR时需要增加一个PCR阳性对照和一个PCR阴性对照，故需要设置N+4个反应。在N+4个PCR管中分别加入下列成分：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **成分** | **N+2个****样品管** | **PCR阴性对照管** | **PCR阳性对照管** |
| 2×PCR MasterMix（电泳法） | 各10 μL | 10 μL | 10 μL |
| 禽致病性大肠杆菌O1血清型 PCR引物混合液 | 各2 μL | 2 μL | 2 μL |
| N+2个样品DNA模板 | 各8 μL | - | - |
| 超纯水 | - | 8 μL | - |
| 禽致病性大肠杆菌O1血清型PCR阳性对照（1×10E4拷贝/μL） | - | - | 8 μL |

1. 按下表设置PCR反应：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **过程** | **温度** | **时间** |
| 预变性 | 94℃ | 5 min |
| PCR反应（35个循环） | 94℃ | 30 sec |
| 50℃ | 30 sec |
| 72℃ | 30 sec |
| 最后延伸 | 72℃ | 5 min |

**三、电泳检测**1. 取10uL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。
2. 阳性样品预期得到的扩增产物长度为260bp。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。
3. 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** | 禽致病性大肠杆菌O1血清型可视化LAMP扩增试剂盒 |

20220418lyh