|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:15-39500****低温运输，-20℃保存** |  |
| **致泻性大肠杆菌探针法qPCR试剂盒*****Diarrheagenic Escherichia coli* Probe qPCR 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**](http://www.bingene.com)**；电话：400-6605850；电邮：order@bingene.com** |
| **产品及特点** | 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，致泻性大肠埃希氏菌)。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％，因此快速检测致泻性大肠杆菌具有重要意义。本产品就是以探针法荧光定量PCR技术为基础开发的专门检测致泻性大肠杆菌的试剂盒，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. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到100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，引物是根据致泻性大肠杆菌DNA高度保守区设计，不会跟其他生物的DNA发生交叉反应。
5. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为5个数量级。
6. 本产品足够50次20μL体系的探针法荧光定量PCR反应。
7. 本产品只能用于科研。
 |
| **规格及成分** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 成分 | 编号 | 规格 | 包装材料 |
| 2×Probe qPCR MasterMix | 981201 | 0.5 mL | 0.5 mL本色盖 |
| 荧光PCR专用模板稀释液 | 180701 | 1 mL | 1.5 mL绿色盖 |
| 超纯水 | 210806 | 1 mL | 1.5 mL蓝色盖 |
| 致泻性大肠杆菌探针法qPCR引物-探针混合液 | yp15-39500 | 150 μL | 1.5 mL棕色盖 |
| 致泻性大肠杆菌探针法qPCR阳性对照(1×10E7拷贝/μL) | pc15-39500 | 50 μL | 0.5 mL黄色盖 |
| 使用手册 | 15-39500sc | 1份 | 无 |

本产品使用五孔盒包装 |
| **运输及保存** | 低温运输，-20℃保存，保存期限为12个月。 |
| **自备试剂** | 样品DNA。 |
| **使用方法** | **一、稀释标准曲线样品**（以10E1-10E6拷贝/μL这6个10倍稀释度为例）。由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分）。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供无传染性的DNA片段作为阳性对照。1. 标记6个离心管，分别为6，5，4，3，2，1。
2. 用带芯枪头分别加入45 μL荧光PCR专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。
3. 在6号管中加入5 μL 1×10E7拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得1×10E6拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在5号管中加入5 μL 1×10E6拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E5拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在4号管中加入5 μL 1×10E5拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1×10E4拷贝/μL的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到6个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

**二、样品DNA的制备**1. 如果有N个样品，最好设置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10μL上步所得4号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为PC。另外用水作为NC。
2. 用自选方法纯化样品的DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品DNA提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

**三、Probe qPCR反应（20μL体系，在样品制备室进行）**1. 如果做定量分析并且只做1次重复，则标记N+9个PCR管，其中N+2个用于上步得到的N+2个样品，1个用于PCR阴性对照（用水做模板），6个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做1次重复，则标记N+4个PCR管，其中N+2个用于上步得到的N+2个样品，1个用于PCR阴性对照（用水做模板），1个用于PCR阳性对照（直接用第6步第4号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
2. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后最后加）：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **成分** | **样品管****N+2个** | **PCR阴性对照** | **标准曲线样品管****（1-6管）** |
| 2×Probe qPCR MasterMix | 各10 μL | 10 μL | 各10 μL |
| 致泻性大肠杆菌探针法qPCR引物-探针混合液 | 各3 μL | 3 μL | 各3 μL |
|  N+2个待测DNA样本 | 各7 μL | 不加 | 不加 |
| 超纯水 | 不加 | 7 μL | 不加 |
| 第6步所得标准曲线样品稀释液（1-6号） | 不加 | 不加 | 各7μL（2号样到2号管，3号样到3号管…） |

1. 盖上盖子后上机，按下面参数进行PCR：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **过程** | **温度** | **时间** |
| 预变性 | 95℃ | 10 min |
| PCR反应（45个循环） | 95℃ | 10 sec |
| 60℃ | 60 sec（采集FAM通道的荧光信号，设置BHQ1为淬灭基团） |

**四、数据处理**1. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的log值为横轴，以Ct值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的Ct值从标准曲线上推算出样品DNA浓度的log值，再推算出其浓度。
2. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照Ct必须没有数值，等于或者大于40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct值应该小于40。对待测样品，如果其Ct小于40则为阳性。如果没有Ct值，或大于或等于40则为阴性。
 |
| **关联产品** | 据致泻性大肠杆菌 DNA 染料法荧光定量 PCR 试剂盒 |

20220506wmx