

EPEC-STEC-EHEC 多重 PCR 检测试剂盒使用说明书

（使用前请仔细阅读本说明书）

【产品名称】

通用名称：EPEC-STEC-EHEC 多重 PCR 检测试剂盒

英文名称：Multiplex PCR Detection Kit for PEC-STEC-EHEC

注：EPEC 表示肠道致病性大肠埃希氏菌 (*Enteropathogenic Escherichia coli*)；STEC 表示产志贺毒素大肠埃希氏菌 (*Shiga toxin-producing Escherichia coli*)；EHEC 表示肠道出血性大肠埃希氏菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*)。

【包装规格】24 测试/盒

【产品编号】KJD02P

【产品简介】

本试剂盒基于 PCR 技术，并适用于食品中 EPEC、STEC 和 EHEC 的检测。

【检测原理】

利用 5 对特异性引物和 PCR 反应所需其他试剂，如反应缓冲液、dNTPs 以及 *Taq* DNA 聚合酶等，加入待检核酸样品，即可进行 PCR 扩增反应。经比对扩增产物目标条带组合即可判定所对应的致泻大肠埃希氏菌类别。

【产品特点】

1. 快速简便：将酶、引物等反应组分混匀后进行干粉化处理，增加试剂稳定性，使用时减少溶液配制步骤，更为便捷，整个检测反应可在 3 h 内完成；
2. 特异性高：由 GB 4789.6-2016《食品微生物学检验致泻大肠埃希氏菌检验》提供的目标基因引物，保证扩增反应的高度特异性；
3. 判读简单：扩增产物经琼脂糖凝胶电泳和紫外仪观察目标条带即可判别，直观方便。

【储存条件与保质期】

2~8℃条件下储存，有效期为 12 个月。

【所需其他材料和适用仪器】

1. PCR 仪器、高速离心机、电泳仪、水平电泳槽、紫外仪、移液器、移液枪头及离心管等；
2. 琼脂糖、溴化乙锭 (EB) 或其他核酸染料。

【产品组分】

编号	组分名称	规格×数量
--	干粉试剂 EP	8 管×3 排
--	干粉试剂 ST	8 管×3 排
--	PCR 复溶液	1 mL×1 管
Y02	阳性对照	1 管 (冻干型)
--	阴性对照	1 管 (冻干型)
--	裂解液	1 mL×1 管
--	超纯水	1 mL×1 管
--	6 × Loading buffer	240 μL×1 管
	说明书	1 份

【使用指南】

1. 样品前处理

- 1) 参照 GB 4789.6-2016, 使用 1 μ L 接种环刮取营养琼脂平板或斜面上培养 18 h~24h 的菌落, 悬浮到含 30 μ L 裂解液的无菌离心管中, 充分悬浮菌体, 轻弹管壁消除气泡, 99 $^{\circ}$ C 加热 10 min;
- 2) 12000 r/min 离心 15 min, 上清即为粗提的 DNA, 可转移至 0.2 mL 无菌离心管中, 在 -20 $^{\circ}$ C 下可长期保存。
2. 加样、反应
 - 1) 首次使用时, 分别加入 80 μ L 超纯水至阳性对照和阴性对照管中, 充分溶解, -20 $^{\circ}$ C 存储待用;
 - 2) 取出冻干粉试剂 EP 和 ST, 按照需求分别剪取 n 个检测试剂管 (n=待检测样品数+1 管阳性对照+1 管阴性对照), 每管加入 18 μ L 复溶液, 充分溶解后待用;
 - 3) 向上述已加入复溶液的 n 个反应管中分别加入待测样品核酸、阴性对照、阳性对照各 2 μ L, 紧盖后置于 PCR 仪中按设定的反应程序进行扩增反应;
 - 4) PCR 反应程序如下:

温度	时间	循环数
94 $^{\circ}$ C	5 min	1
94 $^{\circ}$ C	30sec	} 35
59 $^{\circ}$ C	30sec	
72 $^{\circ}$ C	90sec	
72 $^{\circ}$ C	5 min	1

3. 结果判读

反应后每管中加入 4 μ L 6 \times Loading buffer, 混匀, 并取 8 μ L 样品经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后在紫外仪下观察, 阴性对照仅有 *uidA* 条带扩增, 阳性对照中出现目标条带 (参照图 1), PCR 试验结果成立。根据每个样品对应的冻干粉试剂 EP 和 ST 反应产生的目标条带种类, 并查找该目标条带组合所对应的致泻大肠埃希氏菌类别 (参照表 1), 即为检测结果。若阴阳性对照管反应结果不符, 则本次检测结果无效, 应重新检测或与产品技术支持联系。

【注意事项】

1. 使用本试剂盒前请仔细阅读本说明书全文, 检测过程中建议穿洁净工作服, 戴一次性手套, 使用的枪头需提前灭菌;
2. 干粉检测试剂在使用前低速离心, 确保所有的干粉沉在管底, 加入复溶液如产生气泡用手指轻弹管壁清除, 反应前检查反应
3. 管是否盖紧, 避免泄露造成污染;
4. 试剂盒中反应管材质为聚丙烯, 包装盒材质是纸, 使用完毕废弃时按照医疗废弃物相关规定处理, 由使用者自行负责处理;
5. 不同批号的产品请勿混合使用, 请在有效期内使用试剂盒, 由于操作不当引起的误判, 以及由此误判引发的其他事项, 本公司概不负责。

【生产企业】

企业名称: 广东环凯微生物科技有限公司
 生产地址: 广州市科学城神舟路 788 号
 销售热线: 020-32078333-8602
 技术热线: 020-32078333-8877、8867
 传真号码: 020-32078333-8619
 邮政编码: 510663

企业网址: <http://www.huankai.com>

【说明书修改时间】

2017年12月7日

图1 阳性对照反应产物

注：“M”表示DNA marker;

“EP”表示冻干粉试剂EP阳性对照结果;

“ST”表示冻干粉试剂ST阳性对照结果;

所涉及的基因扩增产物长度分别为:

- *uidA* 1487 bp;
- *bfpB* 910 bp;
- *escV* 544 bp;
- *stx2* 324 bp;
- *stx1* 244 bp。

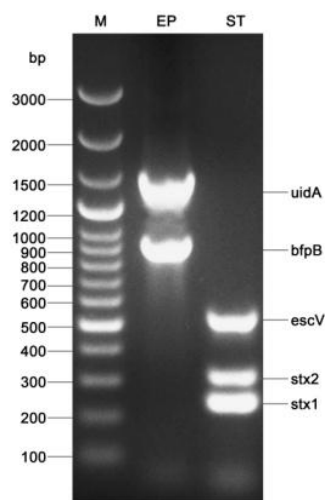


表1 反应产物目标条带与型别对照表

致泻大肠埃希氏菌类别	目标条带的种类组合	
EPEC	<i>bfpB</i> (+/-), <i>escV</i> ^a (+), <i>stx1</i> (-), <i>stx2</i> (-)	<i>uidA</i> ^b (+/-)
STEC / EHEC	<i>escV</i> ^a (+/-), <i>stx1</i> (+), <i>stx2</i> (-), <i>bfpB</i> (-)	
	<i>escV</i> ^a (+/-), <i>stx1</i> (-), <i>stx2</i> (+), <i>bfpB</i> (-)	
	<i>escV</i> ^a (+/-), <i>stx1</i> (+), <i>stx2</i> (+), <i>bfpB</i> (-)	
a 在判定 EPEC 或 STEC / EHEC 时, <i>escV</i> 与 <i>eae</i> 基因等效; b 97%以上大肠埃希氏菌为 <i>uidA</i> 阳性。		