



# 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 血清型探针法荧光定量 PCR 试剂盒

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

官方 Q Q： 2881498548

官方网址： [www.tw-reagent.com](http://www.tw-reagent.com)

监督电话： 021-54845833

## 产品及特点：

肠出血性大肠杆菌（Enterohemorrhagic E. coli、EHEC）就是能引起人的出血性腹泻和肠炎的一群大肠埃希氏菌，其主要血清型为 O157:H7，它可以引起出血性腹泻、肠炎，严重可致死，老年人和儿童易感染。它的感染具有暴发流行的特点，具有强烈的致病性和致死性。此外，其感染剂量极低，不足 10 个细菌即可致病，因此快速检测 E.coli O157:H7 具有重要意义。荧光定量 PCR 是检测传染病的主流技术，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 E.coli O157:H7 的试剂盒。

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，灵敏性高。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据肠出血性大肠杆菌 O157:H7 血清型高度保守区设计，不会跟其他病毒 DNA 发生交叉反应。
5. 本产品足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。

## 规格及成分：

| 编号  | 成分                                                        | 规格               |
|-----|-----------------------------------------------------------|------------------|
| 试剂一 | 2 $\times$ Probe qPCR MagicMix                            | 500 $\mu$ L（本色盖） |
| 试剂三 | 荧光 PCR 专用模板稀释液                                            | 1mL（黄盖）          |
| 试剂二 | 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 血清型 qPCR 引物混合液                           | 100 $\mu$ L（白盖）  |
| 试剂四 | 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 血清型 qPCR 探针                              | 50 $\mu$ L（棕色管）  |
| 试剂五 | 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 血清型 qPCR 阳性对照照(1 $\times$ 10E8/ $\mu$ L) | 50 $\mu$ L（红盖）   |
|     | 使用手册                                                      | 1 份              |

## 运输及保存：

低温运输，-20 $^{\circ}$ C 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 10E2-10E7 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 7, 6, 5, 4, 3, 2。
- 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 7 号管中加入 5 μL 1×10E8 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10E7 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
- 4. 换枪头，在 6 号管中加入 5 μL 1×10E7 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，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。
- 5. 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。
- 6. 放冰上待用。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：

- 7. 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 阳性对照的 10000 倍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。
- 8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容。

三、Probe qPCR 反应(20μL 体系，在样品制备室进行)：

- 9. 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 (用第 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。
- 10. 在标记管中按下表加入各成分 (本表只列出一重复。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)：

| 成份                              | N+2 个样品管 | PCR 阴性对照管 | 标准曲线样品管 2-7 管     |
|---------------------------------|----------|-----------|-------------------|
| 2×Probe qPCR MagicMix           | 10μL     | 10μL      | 各 10μL            |
| 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 血清型 qPCR 探针    | 1μL      | 1μL       | 各 1μL             |
| 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 血清型 qPCR 引物混合液 | 2μL      | 2μL       | 各 2μL             |
| N+2 个待测 DNA 模板                  | 7μL      | --        | --                |
| 超纯水                             | --       | 7μL       | --                |
| 第 7 步所得标准曲线样品稀释液 2-7 号          | --       | --        | 各 7μL2 号样到 2 号管,3 |



|  |  |  |          |
|--|--|--|----------|
|  |  |  | 号样到 3 号管 |
|--|--|--|----------|

11. 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℃ | 3 min                 |
| PCR 反应 40 个循环 | 95℃ | 15 sec                |
|               | 60℃ | 1 min(采集 FAM 通道的荧光信号) |

**四、数据处理：**

12. 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 RNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。

13. 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 必须大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于或等于 30。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性，如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。若重复结果 Ct 值小于 40，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

**五、特别提示：**

本公司的所有产品，仅可用于科研实验，严禁用于临床医疗及其他非科研用途！