天
净
沙
系
列

CAT#:14-31700
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

大肠埃希氏菌(O157: H7)荧光定量 PCR 检测试剂盒

Escherichia coli O157:H7 qPCR Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506
网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>大肠埃希氏菌，俗称大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)，属于革兰氏阴性细菌。大肠杆菌 O157:H7 是肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>, EHEC)的最常见类型，O 表示抗原类型，H7 表示血清型。其感染剂量极低，人体只要摄入 10 个细菌就可以致病，目前还没有特效疫苗，因此大量开展预防检测工作具有重要的意义。目前对 O157 的检测主要是传统分离培养、免疫学和分子水平的 PCR 检测。本试剂盒就是利用实时荧光定量 PCR 技术开发的大肠杆菌 O157:H7 检测试剂盒，它通过荧光染料实时显示样品模板 DNA 的量，并通过坐标曲线表示出来，结果直观准确。它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即开即用，用户只需要提供样品模板，操作简单，定量准确快速。 2. 荧光定量 PCR 检测，反应特异性强。 3. 本产品只适用于科研，不能用于临床诊断。 																				
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>50 次塑料袋包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×qPCR Mix</td> <td>90408</td> <td>1.0 mL</td> </tr> <tr> <td>O157:H7 专一性引物对</td> <td>yw13851386</td> <td>200 μL</td> </tr> <tr> <td>O157:H7 阳性对照， 1.3×10E9 拷贝/μL</td> <td>yw13871388</td> <td>10 μL</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>100935</td> <td>1 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td colspan="2">1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	50 次塑料袋包装	2×qPCR Mix	90408	1.0 mL	O157:H7 专一性引物对	yw13851386	200 μL	O157:H7 阳性对照， 1.3×10E9 拷贝/μL	yw13871388	10 μL	超纯水	100935	1 mL	使用手册	1 份	
成分	编号	50 次塑料袋包装																			
2×qPCR Mix	90408	1.0 mL																			
O157:H7 专一性引物对	yw13851386	200 μL																			
O157:H7 阳性对照， 1.3×10E9 拷贝/μL	yw13871388	10 μL																			
超纯水	100935	1 mL																			
使用手册	1 份																				
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20℃保存，保存期限一年。</p>																				
<p>自备试剂</p>	<p>样品等</p>																				
<p>使用方法</p>	<p>一、样品 DNA 的制备</p> <p>用自选方法提取细菌样品 DNA。注意：DNA 纯化方法是决定检测灵敏度的关键因素。如果不能很好纯化样品 DNA，后面的 PCR 再灵敏也不能提高整体检测灵敏度。</p> <p>二、制备 O157:H7 标准曲线（以 10-10E6 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，本产品不提供活体病毒做阳性对照，只提供没有传染性的、可以直接使用的 DNA 片段作为阳性对照。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 标记 6 个离心管，分别为 6，5，4，3，2 和 1 号。 2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 超纯水（最好用带芯枪头，下同）。 																				

3. 先将本试剂盒提供的阳性对照用 TE 缓冲液或超纯水 10 倍梯度稀释到 10E7 拷贝/ μL (注: 请不要将本试剂盒提供的标准品一次性稀释至 10E7 拷贝/ μL , 建议每次稀释 10 倍, 梯度稀释至 10E7 拷贝/ μL)。
4. 在 6 号管中加入 5 μL 10E7 拷贝/ μL 的 O157:H7 阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 10E6 拷贝/ μL 的阳性对照。
5. 换枪头, 从 6 号管中取 5 μL 溶液到 5 号管中, 充分震荡 1 分钟, 得 10E5 拷贝/ μL 的阳性对照。
6. 换枪头, 从 5 号管中取 5 μL 溶液到 4 号管中, 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的阳性对照。
7. NC 管中不加任何阳性对照。
8. 从 1-6 号管中分别取 5 μL 和待测样品一起进行定量 PCR (见下步), 每个样品做 3 次重复。PCR 后得到每个阳性对照稀释样品的荧光 PCR Ct 值, 并以之为纵轴, 以浓度的对数值为横轴, 绘制标准曲线。

三、PCR 检测 (20 μL 体系)

1. 在 PCR 管中加入下列成分 (待测样品需要做三次重复, 下表只列出一):

成分	样品	阴性对照	阳性对照
2 $\times$ qPCR Mix	10 μL	10 μL	10 μL
待测样品 DNA 模板	1-5 μL	无	无
O157:H7 阳性对照	无	无	5 μL (每个管加一个稀释度的对照)
自备 10 $\times$ ROX (见注)	2 μL	2 μL	2 μL
O157:H7 专一性引物对	2 μL	2 μL	2 μL
补水到	20 μL		

注: 仅 ABI7500、7700 和 7900 仪器需要使用 ROX 作为对照, 其他荧光 PCR 仪器 (如 iCycler IQ、MJ Option、MJ Chromo4、MX3000、MX4000、RotorGene 3000、RotorGene 6000 和 LightCycler480) 不需要使用 ROX。

2. 建议 PCR 反应参数 (具体 PCR 参数可以根据仪器不同而自行优化)

过程	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	10 min

		<table border="1"> <tr> <td data-bbox="632 181 967 264">PCR 反应 (40 个循环)</td> <td data-bbox="967 181 1134 264">94℃</td> <td data-bbox="1134 181 1329 264">15 s</td> </tr> <tr> <td data-bbox="632 264 967 338"></td> <td data-bbox="967 264 1134 338">60℃</td> <td data-bbox="1134 264 1329 338">30 s</td> </tr> </table>	PCR 反应 (40 个循环)	94℃	15 s		60℃	30 s	
PCR 反应 (40 个循环)	94℃	15 s							
	60℃	30 s							
关联产品	鸚鵡热衣原体荧光定量 PCR 检测试剂盒 (CAT#:11-3780)								

3. 数据采集

具体操作按所用仪器推荐的流程进行。本产品中所含的荧光染料在不结合 DNA 时，最大吸收光谱在 471 nm，结合 DNA 时的最大吸收光谱在 500 nm，最大发射光谱在 530 nm。

四、数据处理

以 O157:H7 阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品浓度的 log 为横轴，以 Ct 值为纵轴，通过待测样品的 Ct 值计算出样品 DNA 的浓度。