



超广谱β-内酰胺酶大肠杆菌(大肠埃希氏菌)探针法荧光定量 PCR 试剂盒

产品及特点:

超广谱β-内酰胺酶大肠埃希菌(ESBL-Escherichia coli)是一种在医院内感染的常见机会致病菌,各临床科室以及标本类型中均有检出,科室分布以普外科为主,标本类型以伤口分泌物标本为主,常引起外壳感染性疾病,该细菌对多种抗生素有较强的耐药性,所以医院要加强对该细菌的耐药性的检测与监控,积极做好细菌的培养和药物敏感性试验,规范合理使用抗生素,以控制耐药菌的出现和流行,因此快速检测超广谱β-内酰胺酶大肠埃希菌具有重要意义。荧光定量 PCR 是检测传染病的主流技术,本产品就是以染料法荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测超广谱β-内酰胺酶大肠埃希菌的试剂盒,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,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,引物是根据超广谱β-内酰胺酶大肠杆菌(大肠埃希氏菌)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 20μL 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×Probe qPCR MagicMix | 500μL (本色盖) |
| 试剂三 | 荧光 PCR 专用模板稀释液 | 1mL (黄盖) |
| 试剂二 | 超广谱β内酰胺酶大肠杆菌(大肠埃希氏菌) qPCR 引物混合液 | 100μL (白盖) |
| 试剂四 | 超广谱β内酰胺酶大肠杆菌(大肠埃希氏菌) qPCR 探针 | 50μL (棕色管) |
| 试剂五 | 超广谱β内酰胺酶大肠杆菌(大肠埃希氏菌) qPCR 阳性对照照 (1×10E8/μL) | 50μL (红盖) |



| | | |
|--|------|-----|
| | 使用手册 | 1 份 |
|--|------|-----|

运输及保存:

低温运输, -20°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 $10\text{E}2$ - $10\text{E}7$ 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 1×10^8 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^7 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 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^6 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 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1×10^5 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 10 μL 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 (20 μ L 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):

| 成份 | N+2 个样品管 | PCR 阴性对照管 | 标准曲线样品管 (2-7 管) |
|---|------------|------------|--------------------------------------|
| 2 \times Probe qPCR MagicMix | 10 μ L | 10 μ L | 各 10 μ L |
| 超广谱 β 内酰胺酶大肠杆菌(大肠埃希氏菌) qPCR 探针 | 1 μ L | 1 μ L | 各 1 μ L |
| 超广谱 β 内酰胺酶大肠杆菌(大肠埃希氏菌) qPCR 引物混合液 | 2 μ L | 2 μ L | 各 2 μ L |
| N+2 个待测 DNA 模板 | 7 μ L | -- | -- |
| 超纯水 | -- | 7 μ L | -- |
| 第 7 步所得标准曲线样品稀释液 (2-7 号) | -- | -- | 各 7 μ L (2 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 $^{\circ}$ C | 3 min |
| PCR 反应 40 个循环 | 95 $^{\circ}$ C | 15 sec |
| | 60 $^{\circ}$ C | 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。

上海纪宁实业有限公司(www.shjning.com)所有产品仅供科研使用，不得用于其他用途。