



五种致泻大肠埃希氏菌多重 PCR 检测试剂盒说明书

【产品名称】

通用名称：五种致泻大肠埃希氏菌多重 PCR 检测试剂盒

英文名称：Multiplex PCR Diagnostic Kit for Rapid Identification of Diarrheogenic *Escherichia coli*

【产品货号】MX-2101

【包装规格】24 次反应/盒

【用途】本试剂盒用于 EAEC、EPEC、STEC/EHEC、ETEC、EIEC 5 种致泻大肠埃希氏菌核酸的体外检测，实验结果仅为基础研究提供参考，不作为临床诊断依据。

【运输及保存】

1. 运输：常温或冷藏运输
2. 保存：2℃-8℃冷藏保存（长期不用时建议-20℃保存）
3. 有效期：12 个月

【检验原理】

本试剂盒采用多重 PCR 技术，适用于五种致泻大肠埃希氏菌（EPEC、EHEC、ETEC、EIEC、EAEC）的核酸的体外检测。每个反应体系均含有大肠埃希氏菌种属鉴定和毒力基因检测的十二对特异性引物，根据 PCR 扩增产物的条带大小来判定菌株中含有的毒力基因种类并确定其致病型别。

【试剂盒内容】

| 序号 | 产品组成 | 规格 |
|----|------------|---------|
| 1 | PCR 冻干体系 | 8 管/排×3 |
| 2 | PCR Buffer | 1mL/管×1 |
| 3 | 裂解液 | 5mL/瓶×1 |

【操作步骤】

1. 样本制备：

方法①：参照 GB 4789.6-2016 致泻大肠埃希氏菌检验中 6.5.2 中所述制备；

方法②：按照本说明书进行制备，方法如下：

a) 增菌液检测：取增菌液 1mL 于 1.5mL 离心管中，3000×g 离心 10min 或 10000×g 离心 2min，弃去上清，加入 200μL 裂解液，涡旋混匀，金属浴 99℃或沸水浴裂解 10min，冰浴冷却后 12000×g 离心 2min，取上清即为模板。

b) 菌落检测：用接种环取一环菌落，溶于 200μL 裂解液中，涡旋混匀，金属浴 99℃或沸水浴裂解 10min，冰浴冷却后 12000×g 离心 2min，取上清即为模板。

2. 反应体系配制

- ①从试剂盒中取出试剂到室温，每管加入 PCR Buffer 23μL。
- ②分别取步骤 1 中提取的 2μLDNA 样品加入到 PCR 管中，总反应体积为 25μL。
- ③阳性对照、阴性对照和空白对照体系分别加入相应的阳性对照、阴性对照和无菌去离子水 2μL。

3. 反应条件

预变性 95℃ 5min；变性 95℃ 30s，复性 63℃ 30s，延伸 72℃ 1.5min，40 个循环；72℃ 延伸 10min。将配制完成的 PCR 反应管放入 PCR 仪中，核查 PCR 反应条件正确后，启动反应程序。

【结果分析与判定】

1. 对 PCR 扩增产物进行电泳分析：若选用琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行分离鉴定，推荐使用浓度为 2% 的琼脂糖凝胶，且胶的长度不小于 10cm；建议电压值设定为电泳槽正负极距离(cm)与 5(V/cm)的乘积，



电泳时间一般为 30-45min；推荐使用条带大小间隔 100bp 的 DNA Marker，同时可用阳性对照的 PCR 产物作为特异性分子 Marker。

2.结果判定：>97%的大肠埃希氏菌（包括致泻和非致泻大肠）有 *uidA*(1487bp)的扩增条带。在 *uidA* 条带的基础上，若有毒力基因条带的扩增，则为致泻大肠埃希氏菌。根据 100bp DNA Marker 和（或）阳性对照判断扩增条带大小，进而确定毒力基因种类，结合毒力基因组合方式判定最终致病型别，具体组合方式见下表。

| 致病型别 | 目标条带大小及阳性判定结果组合 | |
|-----------|--|--|
| EAEC | <i>astA</i> (102bp) <i>aggR</i> (400bp) <i>pic</i> (1111bp) | <i>astA</i> , <i>aggR</i> , <i>pic</i> 中一条或一条以上阳性 |
| EPEC | <i>escV</i> (544bp) <i>bfpB</i> (910bp) | <i>bfpB</i> (+/-), <i>escV</i> (+), <i>stx1</i> (-), <i>stx2</i> (-) |
| STEC/EHEC | <i>escV</i> (544bp) <i>stx1</i> (244bp) <i>stx2</i> (324bp) | <i>escV</i> (+/-), <i>stx1</i> (+), <i>stx2</i> (-), <i>bfpB</i> (-); <i>escV</i> (+/-), <i>stx1</i> (-), <i>stx2</i> (+), <i>bfpB</i> (-); <i>escV</i> (+/-), <i>stx1</i> (+), <i>stx2</i> (+), <i>bfpB</i> (-) |
| ETEC | <i>elt</i> (655bp) <i>estla</i> (157bp) <i>estlb</i> (171bp) | <i>elt</i> , <i>estla</i> , <i>estlb</i> 中一条或一条以上阳性 |
| EIEC | <i>invE</i> (766bp) | <i>invE</i> (+) |

**astA*、*pic* 基因可在细菌间转移，当与其他毒力基因同时为阳性时，*astA*、*pic* 基因不作为型别判定依据，如检测 *uidA*、*invE*、*pic* 同时阳性，则判定该菌株为 EIEC；如检测 *uidA*、*elt*、*astA* 同时阳性，则判定该菌株为 ETEC。

【检测方法的局限性】

本试剂盒检测的靶序列为致泻大肠埃希氏菌基因的保守区域，这些基因高度保守稳定。如果细菌在靶序列处发生基因突变，则可能出现假阴性结果，即发生漏检；同时，样品收集、处理、运送和保存的质量均会对检测结果造成影响。鉴于毒力基因可在细菌间转移，实际检测中可存在一株菌中同时含有源自不同型别的致泻大肠埃希氏菌毒力基因的可能性。

【注意事项】

- 1.实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按操作步骤执行。
- 2.试剂盒内各组分在使用前应充分融化混匀并经高速短暂离心后使用。

3.试剂盒必须避光保存，所使用的离心管、Tip 头应高压灭菌，且不含 DNase 和 RNase。整个操作过程和 PCR 实验室的软硬件设施应

符合卫计委颁发《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》、《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》等法规的要求。并恰当处理试验过程中产生的废物和扩增产物，防止交叉污染。

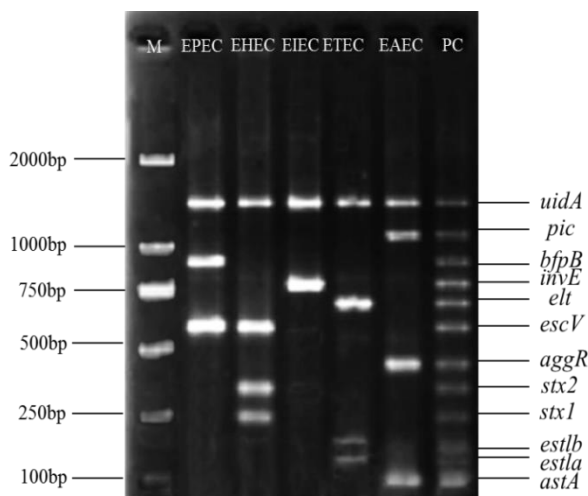


图 五种致泻大肠埃希氏菌与阳性对照电泳图

*M 表示 2000bp DNA Marker，PC 表示 12 重阳性对照，图中五种致泻大肠埃希氏菌型别携带有典型毒力基因，供参考。