

阪崎肠杆菌荧光 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-1120-1

阪崎肠杆菌是近年来在乳制品中发现的一种新的致病菌，为革兰氏阴性菌，肠杆菌科。阪崎肠杆菌可引起严重的新生儿脑膜炎、小肠结肠炎和菌血症，死亡率高达 50% 以上；低免疫力人群有较大风险感染阪崎肠杆菌。目前，乳制品是阪崎肠杆菌的主要感染渠道。

为了适应阪崎肠杆菌快速检测和疫病研究的需要，本公司参考 2005 年国家质量监督检验检疫总局发布的中华人民共和国出入境检验检疫行业标准（SN/T 1632.3-2005）中规定的引物和探针序列，经多次实验及系统优化，开发生产了本试剂盒。应用本试剂盒进行检测具有快速、灵敏、特异、准确、操作简单、应用广泛和高通量检测等特点及优点。

2、试剂盒组成

试剂盒具体组成如下（50 test/盒）：

组成成分	体积
DEPC 水	5 mL×1 管
阪崎肠杆菌荧光 PCR 反应液	800 μL×1 管
Taq 酶(5 U/uL)	30 μL×1 管
阴性对照	1 mL×1 管
阪崎肠杆菌荧光阳性对照	1 mL×1 管

*保存条件：试剂盒须在-20℃保存。

3、样本采集，存放及运输

3.1 样本采集：无菌称取样品 25 g，加入装有 225 mL 45℃ 预热灭菌水的灭菌瓶中，充分混匀后于 37℃ 培养 20 h；取 10 mL 悬液加入 90 mL 肠杆菌增菌肉汤（EE 肉汤）中，37℃ 培养 20 h 备用。

3.2 存放：样本在 2℃-8℃ 条件下保存应不超过 24 h；加入 15%-20% 甘油可于 -70℃ 以下长期保存。

3.3 运输：密封运输，严防泄露污染。

4、检测步骤

4.1 DNA 核酸提取操作方法(在样本处理区进行):

4.1.1 待检样品增菌处理后，取 n 个 1.5 mL 灭菌 Eppendorf 管，其中 n 为待检样品数、一管阳性对照和一管阴性对照之和，对每个管进行编号标记，加入对应样品 1 mL；

4.1.2 于 8,000 r/min 离心 5 min，去上清；

4.1.3 将样品置于 100℃ 干浴或沸水浴 5 min，12,000 r/min 离心 5 min，

4.1.4 吸取上清，即为提取的 DNA，冰上保存待用（提取的 DNA 需在 2 h 内进行 PCR 扩增或放置

公司地址：	联系电话: 400-895-2698	公司主页：
北京市海淀区香山路中国林业科学研	010-62824033	www.halcyonbio.com
究院林木遗传育种国家重点实验室 B	传 真：010-62824033	在线 QQ 客服：
座	邮 箱：haisentong@126.com	737481857
邮政编码：100091		1632557907

于-70℃冰箱内保存)。

注：细菌核酸提取可选配细菌 DNA 柱式提取试剂盒（货号：SK-CE-1），效果更好。

4.2 荧光 PCR 检测

4.2.1 扩增试剂准备（在反应混合物配制区进行）：

从试剂盒中取出相应的荧光 PCR 反应液、Taq 酶，2,000 g 离心 5 s。每个样品测试反应体系配制见下表。

试剂	荧光 PCR 反应液	Taq 酶	合计
用量	14.5 μL	0.5 μL	15 μL

4.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个荧光 PCR 管孔中各分装 15 μL 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 10 μL，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。

4.2.3 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：第一阶段，37℃/5 min；

第二阶段，95℃/3 min；

第三阶段，95℃/5 sec，60 °C/40 sec，40个循环，在第三阶段每次循环的退火延伸时收集FAM荧光。试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和Ct值判定结果。

5、结果判定

5.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

5.2 质控标准

阴性对照无扩增曲线、无 Ct 值或Ct 值 \geq 40。

阳性对照的 Ct 值应 $<$ 30，并出现典型的扩增曲线。否则，此次实验视为无效。

5.3 结果描述及判定

阴性：阴性对照无扩增曲线、无 Ct 值或Ct 值 \geq 40，示样品中无阪崎肠杆菌。

阳性：Ct值 \leq 35，且出现典型的扩增曲线，示样品中存在阪崎肠杆菌。

有效原则： $40 > Ct > 35$ 的样本建议重做，重做结果若仍在此区间，且有明显对数增长期，可判为阳性，否则为阴性。

6、相关技术信息

F: 5'-CCGTTTCGACGTAGCACTGC-3'

R: 5'-CATAGAATTCACGACGACGAACTTC-3'

PROBE: 5'-FAM-TTCAAACGTTTCCTGCGAGAAAGCGG-TAMRA-3'

公司地址：

北京市海淀区香山路中国林业科学研
究院林木遗传育种国家重点实验室 B
座

邮政编码：100091

联系电话：400-895-2698

010-62824033

传 真：010-62824033

邮 箱：haisentong@126.com

公司主页：

www.halcyonbio.com

在线 QQ 客服：

737481857

1632557907