

TaKaRa Code: DCY215

CycleavePCR[®] O-157 (VT1/VT2)
Detection Kit Ver.3.0
(25 μ l 反应 \times 50 次量)

说明书

TaKaRa

宝生物工程(大连)有限公司

目 录

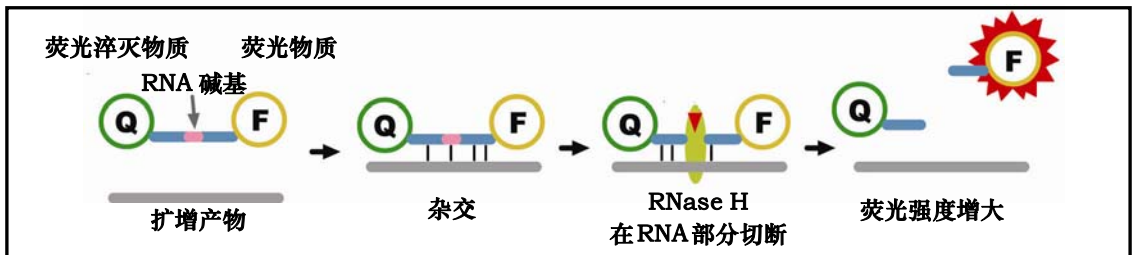
内 容	页 码
●制品说明	1
●制品内容	1
●适用的 Real Time PCR 扩增仪	2
●保 存	2
●操作注意事项	2
●操作流程	2
●结果分析	5

● 制品说明

肠出血性大肠埃希氏菌 (EHEC) 是革兰氏阴性菌, 属于肠杆菌科埃希氏菌。主要包括 O-157: H7 和 O-157: H 两个血清型, O-157: H7 的一个显著特点是能产生大量的志贺样毒素, 此毒素能使 Vero 细胞变性、溶解和死亡, 又被称为 Vero 毒素 (Verotoxin)。本制品使用 Cycling Probe 法对肠出血性大肠杆菌 O157: H7 (enterohemorrhagic Escherichia coli, EHEC) 引起食物中毒的 Vero 毒素基因 VT1 型、VT2 型进行检测的试剂盒。制品中 VT1 基因用 FAM 标记, VT2 基因用 ROX 标记, 内参照用 HEX 标记, 在同一反应管内可以对 Vero 毒素 VT1、VT2 基因及内参照 (Internal Control) 同时进行扩增, 通过三种不同荧光标记的探针可以对 VT1 基因和 VT2 基因及内参照同时检出。其中, 对内参照反应的检测, 可以监控反应是否正常进行, 防止假阴性结果。制品中 DNA 聚合酶使用了改良后的 Hot Start 法用 DNA 聚合酶 TaKaRa *Ex Taq* HS, 可以有效抑制非特异性的 PCR 扩增, 大大提高 PCR 的检测灵敏度。

该检测使用了 Cycling Probe 法。Cycling Probe 法 (原理见下图) 是由 RNA 和 DNA 构成的杂合探针与 RNase H 组合使用的高灵敏度检出法, 能够高效率地检出扩增过程中及扩增结束时的目的基因片段。Cycling Probe 内部含有 RNA 碱基, 一端标记荧光物质, 另一端标记荧光淬灭物质, 当探针处于完整状态时, 由于荧光淬灭作用抑制荧光物质发出荧光, 但当探针与扩增产物中的互补序列杂交后, RNase H 在 RNA 部分将探针切断, 淬灭抑制作用解除, 荧光物质发出荧光, 通过测定荧光强度, 能够实时监控扩增产物量。

Cycling Probe 法技术原理图。本技术由 ID Biomedical 公司授权。



● 制品内容 (25 μ l \times 50 次量)

1. 2 \times Cyclecleave Reaction Mixture (2 \times conc.)	625 μ l
2. VT Primer/Probe Mix (FAM, HEX, ROX 标记) * (5 \times conc.)	250 μ l
3. dH ₂ O	1 ml
4. NaOH Solution (50 mM)	1.5 ml \times 4
5. Tris-HCl Buffer pH 7.0 (1 M)	1 ml
6. dH ₂ O (for Dilution)	1 ml
7. VT1 Positive Control	150 μ l (30 次反应量)
8. VT2 Positive Control	150 μ l (30 次反应量)

* 含荧光标记探针, 应避光保存。

【反应液组份说明】

2 \times Cyclecleave Reaction Mixture: 含有酶、Buffer、dNTP Mixture、内参照 DNA。

内 参 照: 含有与目的基因序列无关的 DNA 分子, 用于判断假阴性结果。所有反应体系中都有内参照, 如果目的基因无检出, 而内参照有检出, 可判定 PCR 反应无阻碍, 目的基因在检出界限以下。如果目的基因、内参照都无检出, 可判定 PCR 反应不正常。但如果目的基因 DNA 量多时, 目的基因的扩增反应会优先进行, 导致内参照扩增起峰较晚、荧光信号强度弱或无信号。这时可以判定目的基因为阳性。

目的基因: Vero 毒素基因 VT1、VT2 型基因。

VT Primer/Probe Mix: 是目的基因与内参照基因的引物与探针的混和液。使用引物对目的基因或内参照基因分别进行扩增, 由不同荧光物质标记的探针分别对目的基因或内参照基因进行特异性检出。目的基因检测用探针 VT1 基因用 FAM 标记, VT2 基因用 ROX 标记, 内参照检测用探针由 HEX 标记。

dH₂O: 灭菌水。

NaOH Solution: 样品制备时使用的 50 mM NaOH 碱变性溶液。

Tris-HCl Buffer pH7.0: 碱变性后中和用溶液。

dH₂O (for Dilution): 中和后样品稀释用灭菌水。

VT1 Positive Control: 检测 VT1 基因用阳性对照。

VT2 Positive Control: 检测 VT2 基因用阳性对照。

【探针标记】

Target	Reporter	Quencher
VT1	FAM	Eclipse
VT2	ROX	Eclipse
Internal Control	HEX	Eclipse

●适用的 Real Time PCR 扩增仪

Smart Cycler II System

ABI PRISM7300/7500 Real-Time PCR System, 7500 Fast Real-Time

PCR System (Applied Biosystems) 等适合上述三通道检出的 Real TimePCR 扩增仪

●保 存: -20℃。

●操作注意事项

1. Real Time PCR 仪的使用请按照说明书进行。
2. 如果杂合探针、引物因混入核酸酶而被降解, 则不能准确进行检测。实验者的汗液和唾液也会带入核酸酶, 操作时应注意。
3. 判断为阳性的样品, 要用微生物学方法进行再确认。
4. PCR 反应是灵敏度非常高的反应。为防止污染, 建议从反应液的配制到检测的实验过程中, 设定以下 3 个实验区域, 并进行物理性隔离。

区域 1: 反应液的配制及分装。此时不要开闭装有扩增产物或检测样品的 Tube 管。

区域 2: 检测样品的制备。此时不要开闭装有扩增产物或检测样品的 Tube 管。

区域 3: 向反应液中添加检测样品, 进行反应、检出。

由于本制品使用 Real Time PCR 法, 扩增反应与检测同时进行, 反应后的扩增产物不需要再进行电泳。为了避免污染, 严禁从 Tube 管中取出扩增产物。

●操作流程

1. 样品的制备。
2. Real Time PCR 仪的准备。
3. 反应液的配制。
配制反应液
↓
将反应液分装到反应管中, 添加阴性对照、检测样品、阳性对照。
↓
将反应管放入 Real Time PCR 仪中, 开始反应。
4. 结果判定。
Real Time PCR 扩增曲线
↓
反应完成
↓
结果判定

1. 样品的制备 (在区域2进行)。

从食品培养液中提取肠出血性大肠埃希氏菌的DNA推荐使用以下碱变性提取法。

【碱变性提取法】

- 1) 取 100 μ l 食品培养液, 加入到 1.5 ml 或者 2.0 ml 的螺旋 Tube 中。
- 2) 10,000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后, 去除上清。
- 3) 沉淀中加入 100 μ l NaOH Solution, 100 $^{\circ}$ C 热处理 10 min。
- 4) 取处理液 50 μ l 加入 8 μ l 1 M Tris-HCl (pH7.0) 进行中和。
- 5) 10,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。
- 6) 取 15 μ l 上清于新的 Tube 中, 加入 35 μ l dH₂O (for Dilution) 作为样品进行使用。
- 7) VT1、VT2 检出时使用 5 μ l 上述变性液作模板。

注) 食品培养液的制备请按照各样品最适操作流程从食品样品中制备。另外, 热变性样品可以在-20 $^{\circ}$ C 保存。

2. PCR反应 (在区域1进行)

以下是使用 Smart Cyclor System 的反应例。

本制品是同一反应管内同时检出 VT1、VT2 和内参照三种产物, 为得到正确的检测结果, 每种目的基因检测同时都需进行各自的阳性对照和阴性对照实验。

- 1) 在冰上配制以下反应液 (在区域 1 进行)。

试剂	使用量
2 \times Cycleave Reaction Mixture	12.5 μ l
VT Primer/Probe Mix (5 \times conc)	5.0 μ l
Sample (模板) or 灭菌水	5.0 μ l
灭菌水	2.5 μ l
Total	25.0 μ l

- 2) 样品 (模板) 的添加 (在区域 3 进行)。

一管作为阴性对照加灭菌蒸馏水, 剩余的 Tube 里添加样品或阳性对照, 盖紧盖。

注) 因为是定量检测, 所以在盖 Tube 管盖时要戴手套, 避免污染。

- 3) 将 Tube 管用小型离心机进行轻微离心, 放置于 Real Time PCR 仪上进行反应。

- 4) 反应条件设定

Stage 1: 初期变性

Hold

95 $^{\circ}$ C 10 秒

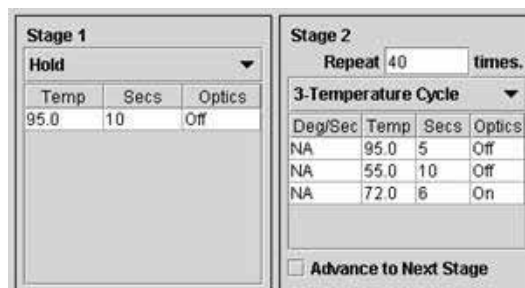
Stage 2: PCR 反应

Repeat 40 times

95 $^{\circ}$ C 5 秒

55 $^{\circ}$ C 10 秒

72 $^{\circ}$ C 6 秒*



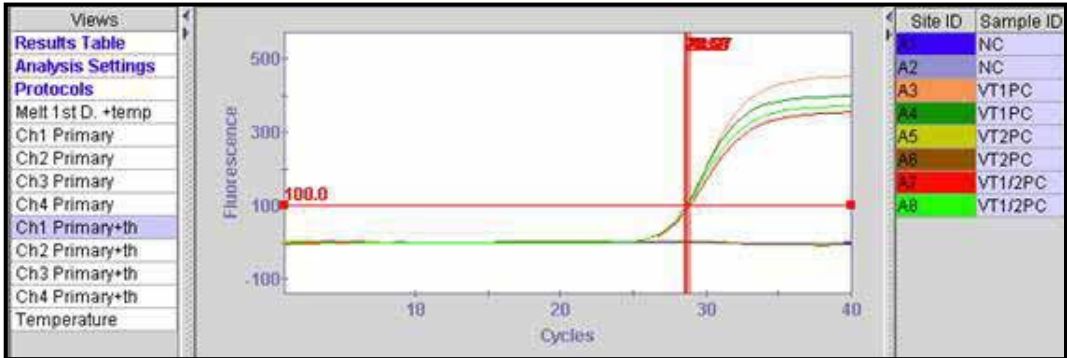
- * 使用仪器不同, 设定时间不同。

使用 Applied Biosystems 公司 Real Time PCR 扩增仪时必须根据仪器型号设定不同时间。7700/7900HT 设定为 30 秒, 7000/7300 设定为 31 秒, 7500 设定为 34 秒, 7500 Fast 设定为 25 秒。

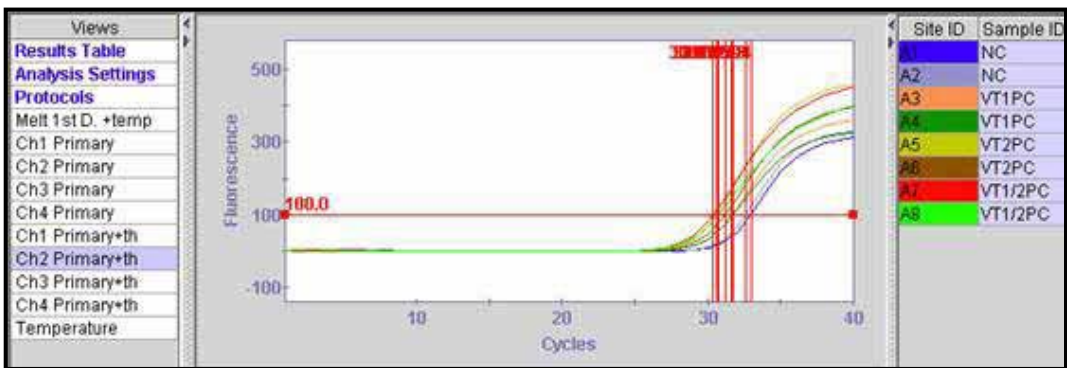
其它仪器设定时间根据仪器使用说明在一定范围内进行调整。

3. 使用Real Time PCR仪进行反应和结果判定（在区域3进行）。

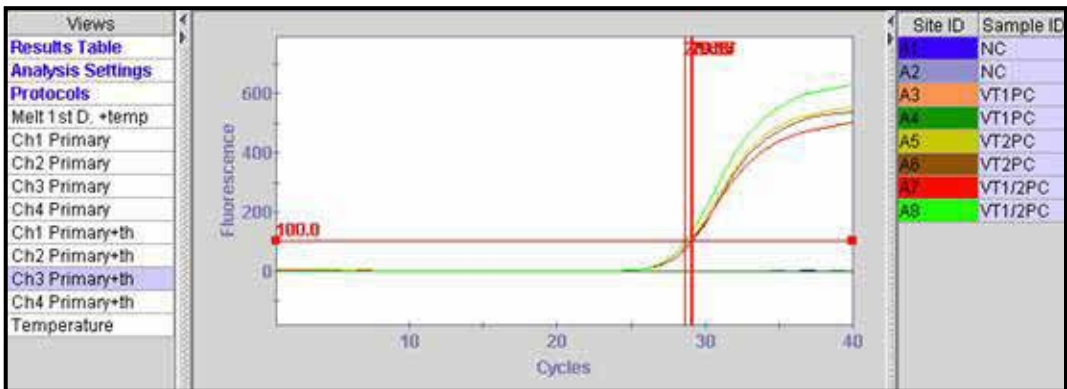
[Ch1通道 (FAM) VT1扩增曲线]



[Ch2通道 (HEX) 内参照扩增曲线]



[Ch3通道 (ROX) VT2扩增曲线]



VT1 检出 I.C 检出 VT2 检出

Views	Site ID	Protocol	Sample ID	Status	FAM Std/Res	FAM C	HEX Std/Res	HEX C	TxR Std/Res	TxR C
Results Table	A1	CY203	NC	OK	NEG	0.00	POS	32.94	NEG	0.00
Analysis Settings	A2	CY203	NC	OK	NEG	0.00	POS	32.58	NEG	0.00
Protocols	A3	CY203	VT1PC	OK	POS	28.69	POS	31.65	NEG	0.00
Melt 1st D. +temp	A4	CY203	VT1PC	OK	POS	28.59	POS	31.72	NEG	0.00
Ch1 Primary	A5	CY203	VT2PC	OK	NEG	0.00	POS	30.61	POS	29.06
Ch2 Primary	A6	CY203	VT2PC	OK	NEG	0.00	POS	31.17	POS	29.17
Ch3 Primary	A7	CY203	VT1/2PC	OK	POS	28.87	POS	30.35	POS	29.06
Ch4 Primary	A8	CY203	VT1/2PC	OK	POS	28.65	POS	30.70	POS	28.66
Ch1 Primary+th										
Ch2 Primary+th										
Ch3 Primary+th										
Ch4 Primary+th										
Temperature										

●结果分析

Real Time PCR 40 Cycles 反应 FAM 的检出荧光信号值在 100 以上时，“Results Table”的“FAM Std/Res”（VT1 基因荧光信号值检出结果）表示为 POS。荧光信号值在 100 以下时表示为 NEG。ROX 的检出荧光信号值在 100 以上时，“Results Table”的“ROX Std/Res”（VT2 基因荧光信号值检出结果）表示为 POS。荧光信号值在 100 以下时表示为 NEG。“HEX Std/Res”（内参照荧光信号检出结果）也表示同样结果。

根据以上结果表示，参照以下结果判定表进行判定。

结果判定表 1：添加 Sample 时（结合各 Control 反应的结果进行最终判定）。

		HEX (内参照)	
		POS	NEG
FAM (VT1 基因)	POS	VT1 基因阳性*1	VT1 基因阳性*1
	NEG	VT1 基因在检出界限以下*2	不能判定*3
ROX (VT2 基因)	POS	VT2 基因阳性*1	VT2 基因阳性*1
	NEG	VT2 基因在检出界限以下*2	不能判定*3

判定结果表 2：VT1 Positive Control (VT2 Negative Control)

		HEX (内参照)	
		POS	NEG
FAM (VT1 基因)	POS	VT1 检测体系没有问题	VT1 检测体系没有问题
	NEG	VT1 检测体系有问题*4	不能判定*3
ROX (VT2 基因)	POS	怀疑有 VT2 污染*6	怀疑有 VT2 污染*6
	NEG	没有 VT2 污染 *2	不能判定*3

判定结果表 3：VT2 Positive Control (VT1 Negative Control)

		HEX (内参照)	
		POS	NEG
FAM (VT1 基因)	POS	怀疑有 VT1 污染*6	怀疑有 VT1 污染*6
	NEG	没有 VT1 污染 *2	不能判定*3
ROX (VT2 基因)	POS	VT2 检测体系没有问题	VT2 检测体系没有问题
	NEG	VT2 检测体系有问题*5	不能判定*3

判定結果表4: Negative Control (添加灭菌蒸馏水)

		HEX (内参照)	
		POS	NEG
FAM (VT1 基因)	POS	怀疑有 VT1 污染*6	怀疑有 VT1 污染*6
	NEG	没有 VT1 污染 *2	不能判定*3
ROX (VT2 基因)	POS	怀疑有 VT2 污染*6	怀疑有 VT2 污染*6
	NEG	没有 VT2 污染 *2	不能判定*3

*1: 不管内参照的HEX信号是POS/NEG, 都判定为VT1基因或者VT2基因阳性。从Negative Control的反应结果来判定反应有无污染。

*2: 如果同时Positive Control反应信号是POS, 则可确定反应体系正常。

*3: 由于某种原因导致PCR反应或Cycling Probe的检出异常, 请再次进行反应; 如果Sample中可能含有反应阻害物, 应将Sample稀释后进行再次反应; 有时需要重新制备检测样品。

*4: VT1 Primer/Probe Mix有问题或VT1 Positive Control 降解。

*5: VT2 Primer/Probe Mix有问题或VT2 Positive Control 降解。

*6: 有污染产生。将反应液配制场所及使用仪器进行除污染处理后, 将所有样品再次进行反应。

MEMO

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
8008909508, 4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话： 0411-87641681 87641683

传 真： 0411-87619946 87621675

E.mail: service@takara.com.cn

网 址： <http://www.takara.com.cn>

V2010.06

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂