

Code No. 7730/7730S

研究用

TAKARA

Viable *Legionella* Selection Kit
for LC EMA-qPCR

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	2
● 保 存	2
● 试剂盒外所需试剂及仪器	2
● 使用注意事项	3
● 操作注意事项	4
● 操作流程	4
● 检测结果的判定标准	6
● 参考文献	7
● 关联产品	7

● 制品说明

长期以来微生物的检测及分类主要采用培养法，但 PCR 法以其简便性和快速性在基因检测技术上越来越受到重视，在食品、环境领域逐渐得到广泛普及。但基因检测技术在原理上不仅可以检测出活菌 DNA，也可以检测出死菌 DNA，有时会因检测出死菌 DNA 而造成出现假阳性的现象。

本公司的 Viable Bacteria Selection Kit for PCR 系列产品是一种以 EMA-PCR 法（见下图）对活菌 DNA 进行选择检测的试剂盒。本试剂盒通过特别的研发技术，能实现高效的 EMA 处理，在进行 Real Time PCR 反应时，即使扩增很短片段，死菌 DNA 也能有效被抑制。

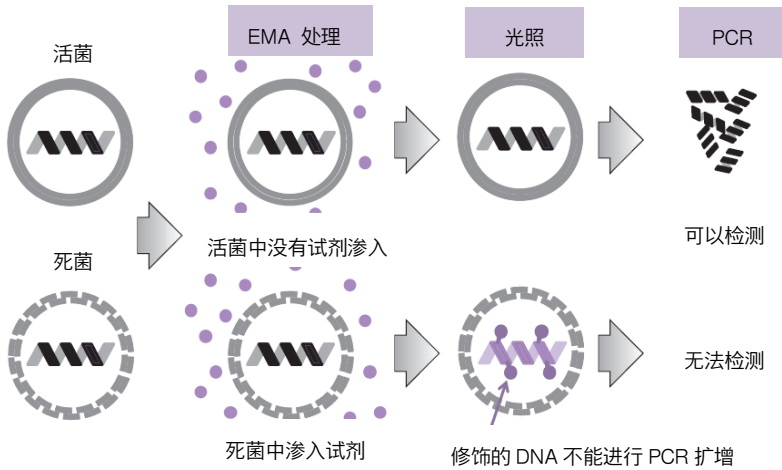
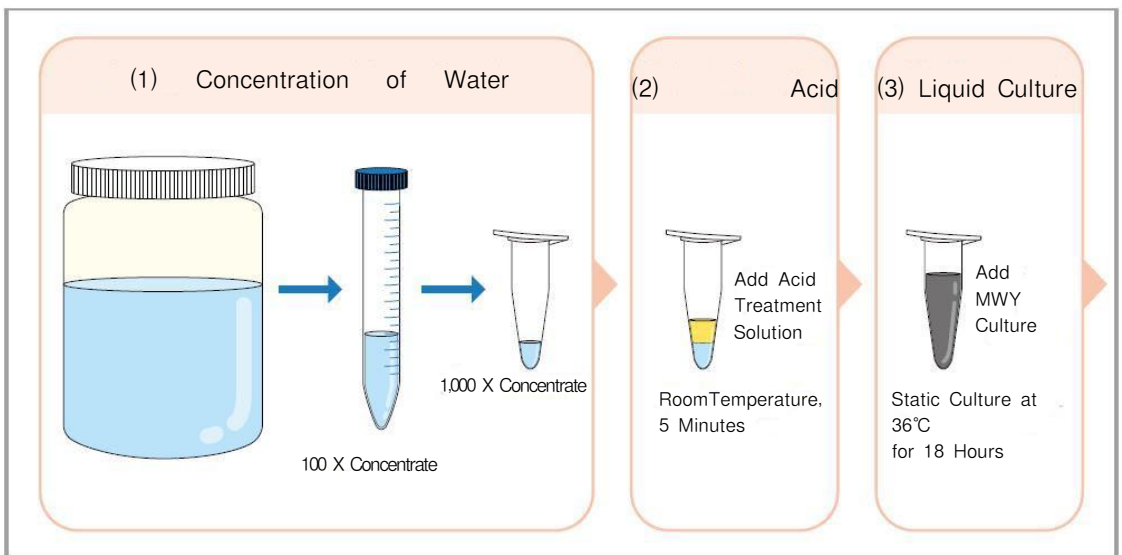


图 1.EMA-PCR 法

改良的 LC EMA-qPCR 法是通过液体培养 (LC : liquid culture) 选择性培养活菌，并结合 EMA-qPCR 法，可准确、高感度地进行活菌检测。

本制品是适用于军团菌在 LC EMA-qPCR 时进行 EMA 处理的试剂盒。试剂盒中含有的 EMA 处理所需试剂，与检测样品浓缩、液体培养、DNA 提取及 Real Time PCR 时的所需试剂配套使用，可利用 LC EMA-qPCR 法对军团菌的活菌进行选择检测。

第一天



第二天

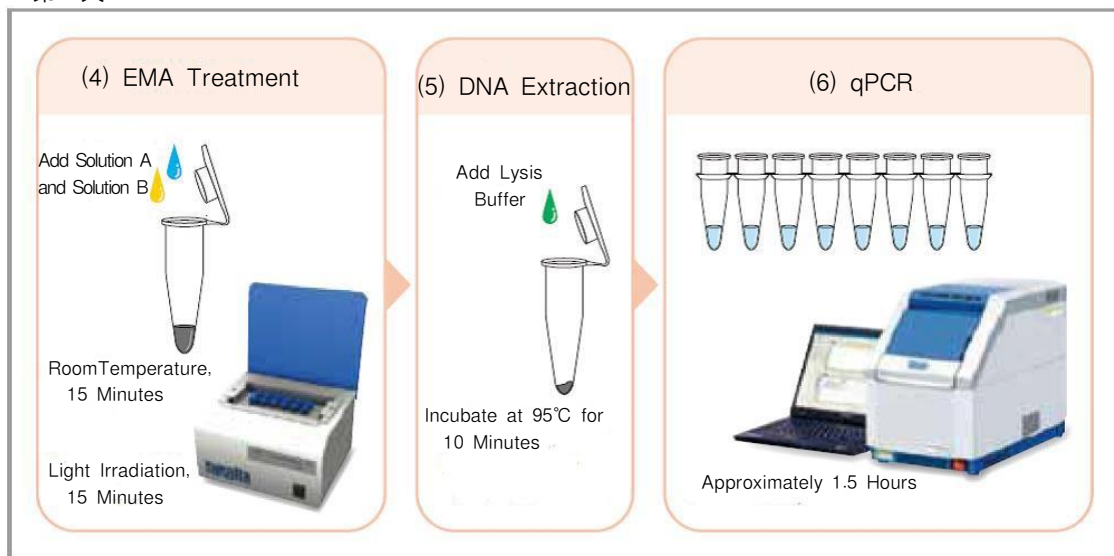


图 2. LC EMA-qPCR 法的操作流程

● 制品内容 (7730: 50 次量, 7730S: 25 次量)

	Code No.7730	Code No.7730S
1. Solution A-leg(LC)	625 μl x 2	625 μl x 1
2. Solution B-leg(LC)*	200 μl x 4	200 μl x 2

*避光保存。光照诱导的化学反应改变溶液的物理特性，并且大幅降低核酸修饰能力。

Solution A-leg(LC)：是适用于军团菌 LC EMA-qPCR 检测法的促进核酸修饰反应的试剂。含有确认 EMA 处理是否成功的质粒 DNA。

Solution B-leg(LC)：是适用于军团菌 LC EMA-qPCR 检测法的含选择性渗透染料 EMA 的溶液。

【注】

与另行销售的 Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) (Code No. CY290) 配套使用，确认使用 Viable Bacteria Selection Kit for PCR 系列产品进行前处理时不受检测样品成分的抑制，能否正确进行前处理。

Viable Bacteria Selection Kit for PCR 系列产品试剂中已含有用于确认反应性能的质粒 DNA，检测样品前处理正常时，质粒 DNA 也同时被修饰处于不能进行 PCR 扩增的状态。因此对已进行了前处理的检测样品，以质粒 DNA 为目的基因进行 PCR 扩增可确认前处理是否成功。

● 保 存：-20℃

● 试剂盒以外所需试剂及仪器

【检测水样的浓缩】

过滤器支架 (47 mm 滤膜用)

膜过滤器 (直径 47 mm、孔径 0.22 μm；如 Millipore 公司 Code GTTP04700、Isopore 膜过滤器等)

过滤瓶

吸泵

镊子

50 ml 灭菌锥形管

【液体培养】

酸处理液 (Muto Pure Chemicals Code. 41281、0.2 M 盐酸/氯化钾缓冲液 pH2.2)

Legionella LC Medium Base (Code No. 9016)

Legionella BCYE Growth Supplement (Thermo Fisher Scientific, Oxoid, Code. SR110)

Legionella MWY Selective Supplement (Thermo Fisher Scientific, Oxoid, Code. SR118)

恒温箱 (36°C)

【EMA 处理】

LED Crosslinker 12 (Code No. EM200)

【DNA 提取】

Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 (Code No. 9183) *1

或 Lysis Buffer for *Legionella* (Code No. 9181)

*1: 使用 Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2, 可以使用 Filter Column 除去杂质, 从而更轻松地回收 DNA 溶液。

【Real Time PCR】

CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (Code No. CY240)

Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) (Code No. CY290)

[注意] 本制品不能与 CycleavePCR *Legionella* (5S rRNA) Detection Kit Ver.2.0 (Code No. CY210) 配套使用。进行 Real Time PCR 反应时, 必须使用 CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit。

Real Time PCR 反应用 PCR 仪及专用反应管

- Thermal Cycler Dice Real Time System // (Code No. TP900/TP960: 终卖)

- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760)

- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) 等

【其他】

Heat Block (可 95°C 使用)

微量高速冷冻离心机

桌面离心机

涡旋振荡器

微量移液枪及专用枪头 (附带疏水滤膜)

1.5 ml 微量反应管 *2

*2: EMA 处理时建议使用无色透明的反应管。本公司使用过的反应管如下:

DNA LoBind tubes, 1.5 ml PCR clean (Eppendorf: Code 0030108051)

1.5 ml screw top microtubes (SARSTEDT: Code 72.692.100)

● 使用注意事项

下面是使用本制品时的注意事项, 使用前请务必认真阅读。

1. 使用目的: 本试剂盒是用于环境分析的制品。
2. 检测结果: 使用本制品进行前处理后, 再使用 CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit 进行 Real Time PCR 反应虽然可区分军团菌的活菌 DNA 和死菌 DNA, 但前处理因死菌量及检测水样成分的影响, 有时也可以检测出死菌 DNA。因此, 根据实验目的, 建议在培养法检测的基础上进行综合性结果判定 (检测结果判定发生问题时, 本公司概不负责)。
3. 废弃: 有污染的检测样品, 请按照各设施的安全规定进行妥善处理。操作区要保持清洁, 要穿实验服, 戴口罩、手套和护目镜等。如有需要对检测样品和使用器材进行 121°C、20 分钟的高压灭菌或 2.5% 次氯酸钠处理后, 再按照各设施的污染性废弃物处理条例进行处理。含 EMA 的试剂废弃时, 进行活性炭过滤吸附色素后再废弃。塑料容器、滤纸等实验器具请按照各自的废弃物处理及清扫相关条例进行处理。

● 操作注意事项

1. 仪器及试剂的使用请按照各自的说明书进行操作。
2. 如果 Solution B-leg(LC)经光照劣化后,对死菌 DNA 的修饰效果就会降低,因此不能区别活菌和死菌 DNA。操作中要注意避光。不使用时用铝箔包好避光保存。使用后装入铝箔盒后冷冻保存。
3. Solution A-leg(LC)因溶液粘度大,要缓慢吸打。
4. 各试剂融解后,充分混匀离心再使用。
5. 吸取试剂时,请使用新的一次性枪头,避免污染。

● 操作流程

A. 液体培养 (Liquid Culture)

1. 检测水样的浓缩

(1) 将500 ml检测水样100倍浓缩至5 ml。

(参照“Legionnaire’s Disease Prevention Guidelines, 3rd Edition”中记载的「过滤浓缩法」。)

(2) 将1 ml的100倍浓缩液15,000 rpm离心5分钟后,弃900 μ l上清,剩余的100 μ l作为1,000倍浓缩液。

*: 剩余的100倍浓缩液根据需要4°C保存。

2. ATP测定 (可选择)

(1) 100倍浓缩液的ATP值测定。

例: 使用ATP荧光检测仪 (Kikkoman Biochemifa)

- 将棉棒浸入100倍浓缩液后直接测定(相当于10 ml检测水样)
- 5,000 RLU(相对光单位)以上的检测样品,对1,000倍浓缩液和100倍浓缩液同时进行以下操作时,将A-3-(2)的酸处理时间延长至20分钟。

3. 酸处理

(1) 在100 μ l的1,000倍浓缩液(或100倍浓缩液)中加入100 μ l酸处理液。

(2) 室温静置5分钟(或20分钟)。

4. 液体培养 (Liquid Culture)

(1) 加入900 μ l MWY液体培养基*, 轻轻振荡混合。

(2) 将A-4-(1)的浓缩样品+MWY液体培养基在36°C下静置培养18小时。

(3) 培养后, 振荡混合, 取100 μ l至1.5 ml微量反应管中。

*: 培养后, 不立即进行EMA处理时, 4°C保存。

*: 剩余的浓缩样品+MWY液体培养基根据需要4°C保存。

*: MWY培养基的制备方法

1. 取出90 ml *Legionella* LC Medium Base放置至室温。

2. 使用10 ml灭菌水溶解*Legionella* BCYE α growth supplement (无菌操作)。

3. 混合步骤1.和步骤2.的溶液。(无菌操作)

4. 使用2 ml灭菌水溶解*Legionella* MWY Selective Supplement, 并加至步骤3.溶液中, 混合均匀。(无菌操作)

5. 取1 ml分装于无菌microtube中, 于-20°C保存。(注意: 活性炭可能会堵塞移液器枪头)

B. EMA处理

1. 在A-4-(3)分取的100 μ l样品中加入25 μ l Solution A-leg (LC)。

[注意]: 因Solution A-leg (LC)粘性大, 使用移液枪时要缓慢吸取, 确认分取量后再添加。

2. 加入12.5 μ l Solution B-leg (LC)。

[补充]: 检测样品数量多时, 也可先配制所需量+ α 的Solution A-leg (LC) & Solution B-leg (LC)

的混合液，分装于微量反应管中。因溶液粘性大，注意要充分混匀后再分装。

3. 用振荡器混匀后，用手轻弹（管盖及管壁水滴可落回到管底的程度）。或者吸打混匀。

[注意]：混匀后不可使用离心机离心。离心操作会使活性碳和军团菌一起形成沉淀，导致光照不充分。

4. 避光、室温静置 15 分钟。

（这期间活性碳会发生沉降，军团菌处于悬浮状态。）

5. LED Crosslinker 12 (Code No. EM200) 光照 15 分钟。

[注意]：然后继续进行 C-1 操作，在此状态下不可保存样品。（C-1 操作后，可以暂时保存样品）

C. DNA 提取

使用 Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 时

※ 请参考制品说明书操作。

1. 将 B-5 的 EMA 处理样品 12,000~15,000 rpm（最高速）、4℃离心 5 分钟，使用移液器轻轻吸取去除 112.5 μl 上清，剩余 25 μl。
2. 在 1 的残留液中加入 25 μl Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2，轻微振荡混合后离心。

[注意]：Lysis Buffer for *Legionella* 4℃保存，严禁冷冻保存。

使用前用振荡器充分混合。分取前吸打混合，注意要使树脂混合均匀。使用的枪头很细时，会堵塞枪头，将枪头剪断后再使用。

3. 95℃孵育 10 分钟。
4. 轻微振荡混合后，全部加入 Filter Column 中。
5. 11,000 × *g* 离心 1 分钟。
6. 回收约 50 μl 洗脱液作为 DNA 溶液。

※ 提取液呈蓝色，对 Real Time PCR 反应无影响。

※ 提取 DNA 后、不立即进行 Real Time PCR 反应时，-20℃保存。

使用 Lysis Buffer for *Legionella* 时

※ 请参考制品说明书操作。

1. 将 B-5 的 EMA 处理样品 12,000~15,000 rpm（最高速）、4℃离心 5 分钟，弃上清。
注意不要吸取沉淀。（可残留少量液体）。

*：去除上清后的沉淀可-20℃保存。

2. 在 1 的沉淀中加入 50 μl Lysis Buffer for *Legionella*，轻微振荡混合后轻轻离心。

[注意]：Lysis Buffer for *Legionella* 4℃保存，严禁冷冻保存。

使用前用振荡器充分混合。分取前吸打混合，注意要使树脂混合均匀。使用的枪头很细时，会堵塞枪头，将枪头剪断后再使用。

3. 95℃孵育 10 分钟。
4. 轻微振荡混合后，15,000 rpm（最高转速）、4℃离心 10 分钟。
5. 冰上静置 5 分钟。
6. 回收 25 μl 上清作为 DNA 溶液。

※ 提取液呈蓝色，对 Real Time PCR 反应无影响。

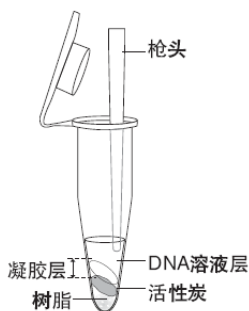
※ 提取 DNA 后、不立即进行 Real Time PCR 反应时，-20℃保存。

【补充】

Lysis Buffer for *Legionella* 中含有低浓度的凝胶，C-4 离心后，会在树脂上形成肉眼不可见的凝胶层。C-5 的处理能够使凝胶层彻底凝固。所以在收集上清液时应注意从 DNA 溶液层表面吸取，避免触碰凝胶层。

◆ 要点 ◆

收集上清液时应靠近上清液面处吸取，避免触碰凝胶层。



D. Real Time PCR 反应 (军团菌的检出)

C-6 制备的 DNA 溶液使用 CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (Code No. CY240/S) 进行 Real Time PCR 反应。

※ 从 CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit 说明书的「操作流程」的「Real Time PCR 反应液的配制」开始操作。

另外, C-6 制备的 DNA 溶液使用 Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) 进行预实验, 确认本试剂盒试剂中含有的用于确认反应性能的质粒 DNA, 经前处理后在 qPCR 检测时无检出, 以此证明使用本试剂盒可正确进行 EMA 处理。

【备注: 死菌的制备方法】

为了研讨条件, 制备死菌时, 进行 95°C 热处理 2 分钟或 1 ppm 次氯酸钠处理 30 分钟。因离心浓缩含菌体沉淀操作, 因此不要使用 DNA 游离于细胞外的制备方法。

● 检测结果的判定标准

作为判定标准的参考信息, 下面介绍「厚生劳动省研究经费补助金 (健康安全·危机管理对策综合研究事业) 公共浴场等含军团菌对策的综合卫生管理方法相关研究 2012 年度分担研究报告书」中的报告内容。

1. 使用 LC EMA-qPCR 法测定 1 CFU 军团菌的 16S Positive Control 的拷贝数

将阿米巴培养的军团菌 10 倍梯度稀释后, 分别进行 N=2 的 LC EMA-qPCR 反应后制作了标准曲线。以回归方程式的截距与 16S Positive Control 回归方程式的截距差按照下面的公式可计算出相当于 1 CFU 军团菌的 16S Positive Control 的拷贝数。

○ 培养 18 小时 EMA 处理后的拷贝数 (相当于 1 CFU 军团菌)

$$2^{(39.984-33.276)} = 104.5 \approx 100 \text{ Copies}$$

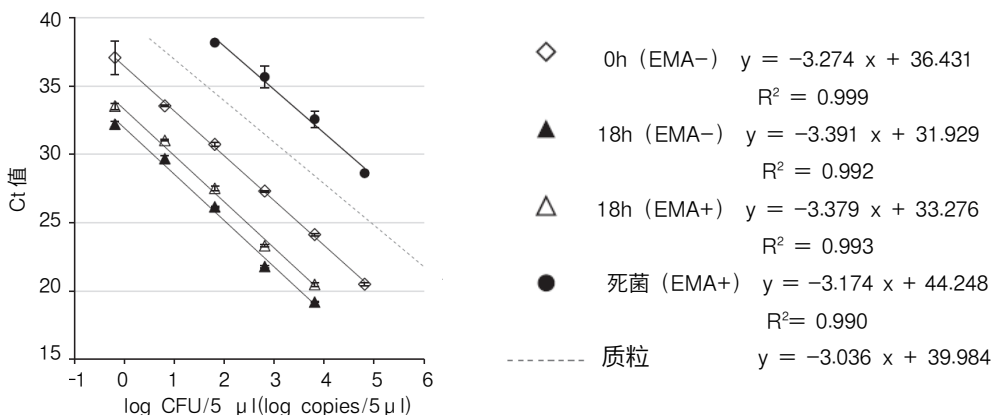


图 3. 阿米巴培养的军团菌进行 LC EMA-qPCR 反应的标准曲线。

说明:

◇ 0 h (EMA-) : 0 h(培养前) 未进行EMA处理

▲ 18 h (EMA-) : 18 h(液体培养后) 未进行EMA

△ 18 h (EMA+) : 18 h(液体培养后) EMA 处理

● 死菌(EMA+) : 死菌 EMA 处理

--- 质粒 : 16S Positive Control (log copies/5 μl)

※ 在上述检测中, DNA 提取使用 Lysis Buffer for *Legionella*, 但是即使使用 Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2, 从拷贝数到 CFU 的换算值也应使用与上述相同的值。

2. 使用 LC EMA-qPCR 法的水检测结果

对 2012 年采集的 113 件浴槽水进行了平板培养法(CFU)和 LC EMA-qPCR 法的定量值比较。平板培养法 38.9% (44/113) 为阳性军团菌 (≥ 10 CFU/100 ml), 而培养 18 小时进行 EMA 处理后, 63.7% (72/113) 为阳性军团菌 (≥ 1 CFU/100 ml), 灵敏度为 95.5%, 特异性为 75.4%。并且, 对于后者的定量结果, 以 ≥ 5 CFU/100 ml 为阳性时, 获得灵敏度为 95.5%、特异性为 56.5% 的良好定量结果, 因此以临界值为相当于 5 CFU/100 ml 的定量值, 可以认为平板培养阳性检出为 10 CFU/100 ml。

表 1. 平板培养法与 LC EMA-qPCR 法的比较 (n=113)

		平板培养法 (CFU/100 ml)		总计
		≥ 10	< 10	
LC EMA-qPCR (CFU/100 ml)	≥ 5	42	17	59
	< 5	2	52	54
总计		44	69	113

灵敏度为 95.5%, 特异性为 75.4%。

● 参考文献

- 1) Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques*. 2003. **34**(4):804-8, 810, 812-3.
- 2) Legionnaire's Disease Prevention Guidelines, 3rd Edition (Publisher: Building Management Education Center) (Japanese)
- 3) 2012 allotment research report: Health, Safety and Risk Management Countermeasures Comprehensive Research Project "Research on comprehensive health management techniques, including *Legionella* spp. measures in the public baths, etc." Health and Labour Sciences Research Grant (Japanese)

● 关联产品

CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (Code No. CY240/CY240S)

Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 (Code No. 9183)

Lysis Buffer for *Legionella* (Code No. 9181)

Legionella LC Medium Base (Code No. 9016)

Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) (Code No. CY290)

LED Crosslinker 12 (Code No. EM200)

Thermal Cycler Dice™ Real Time System III with PC (Code No. TP970)

Thermal Cycler Dice™ Real Time System Lite (Code No. TP700/760)

Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative) (Code No. 7700)

Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Positive) (Code No. 7705)

Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver.2.0 (Code No. 7714)

CycleavePCR and Thermal Cycler Dice are trademarks of Takara Bio Inc..

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考Takara Bio Inc.网站。为正确使用Takara产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>