

Code No. CY205

研究用

TAKARA

CycleavePCR™ *Salmonella*
Detection Kit Ver.2.0

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	2
● 试剂盒外所需器材	2
● 使用前的注意事项	2
● 操作注意事项	2
● 操作流程	3
A. 样品的制备	3
B. 反应液的配制	3
C. 使用 Real Time PCR 仪进行反应和结果判定	4
● 结果分析	8
● 应用于食品检测的实验例	9
● 参考文献	9
● 关联产品	9

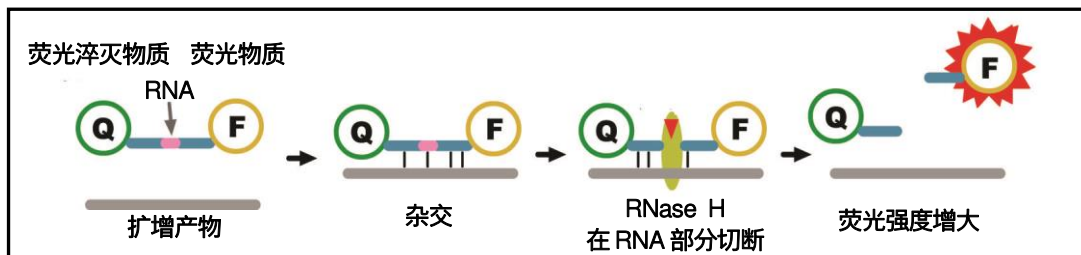
● 制品说明

沙门氏菌 (*Salmonella*) 是与 *E.Coil* 和 *Shigella* 同属于一群的重要肠道致病菌，这一类细菌在自然界中分布很广，其中有 2,500 多种被确认为血清型。近年来由于 *Salmonella* Enteritidis 引起的食物中毒急剧增加。

本制品是对大部分沙门氏菌都具有的基因 – 侵袭蛋白 A (invasion protein A, *invA*) 基因进行快速、准确检出的 Real Time PCR 试剂盒。在 PCR 反应中每个循环包括三个过程：模板变性、引物退火、聚合酶作用下的延伸，该反应可以实现目的基因的指数倍扩增，使用 Real Time PCR 可实时监测扩增过程。制品中使用了改良后的 Hot Start 法用 DNA 聚合酶 *TaKaRa Ex Taq HS*，可防止在循环反应前因引物错配、引物二聚体所产生的非特异性扩增。

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。

制品中检测沙门氏菌 *invA* 基因的探针荧光物质使用了 FAM 标记，内参照检测用探针的荧光物质使用了 ROX 标记，在同一反应管内对沙门氏菌 *invA* 基因及内参照 (Internal Control) 同时进行扩增，通过两种不同荧光标记探针可以对 *invA* 基因和内参基因同时检定，实现双通道同步检测。其中，对内参照反应的检测，可以监控反应是否正常进行，防止假阴性结果的产生。本检测无需电泳，简单快速，灵敏度高、特异性强。



Cycling Probe 法技术原理图

● 制品内容 (25 μ l \times 50 次量)

1. 2X Cycleave Reaction Mixture (2X conc.)	625 μ l
2. SIN Primer/Probe Mix (FAM, ROX 标记) * (5X conc.)	250 μ l
3. dH ₂ O	1 ml
4. SIN Positive Control	150 μ l (30 次反应量)

* 含荧光标记探针，应避光保存。引物由 SHIMADZU CORPORATION 生产制造。

【制品组份说明】

2X Cycleave Reaction Mixture: 含有酶、Buffer、dNTP Mixture、内参照DNA。

SIN Primer/Probe Mix: 是检测 *invA* 目的基因与内参照引物与探针的混合液。使用引物对目的基因或内参照分别进行扩增。目的基因检测用探针由 FAM 标记、内参照检测用探针由 ROX 标记。

目的基因: 沙门氏菌侵入因子相关的基因 *invA* 基因。

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 反应无损害，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。

dH₂O: 灭菌水。

SIN Positive Control: 检测*invA*基因用阳性对照。

● 保 存: -20℃

● 试剂盒外所需器材

[仪器]

- Real-time PCR 仪
Thermal cycler Dice Real Time system // (Code No. TP900/TP960) *1
Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific), etc.
*1. Thermal cycler Dice Real Time system 的八联管 (Code No. NJ 600) 需要额外购买，使用该产品可降低操作的污染风险，故推荐使用。
- 加热模块 (温度可设定为 95℃)

[其他]

- 用于 PCR 的管或 96 孔板
- 1000 μl, 200 μl, 20 μl 和 10 μl 移液枪
- 移液枪配套枪头 (带有疏水滤膜)
- (桌面) 小型离心机
- 低温离心设备 (可设置 4℃)

● 使用前的注意事项

- 由于本试剂盒是基因检测试剂盒，不仅能够以活菌为检出对象，同时也可以检测死菌。另外，设计的 Probe/Primer 序列内发生基因变异、缺失/或插入时，可能会出现无法检出的情况。(关于检测结果判定时产生的相关问题，Takara Bio 不承担任何责任。)
- 判断为阳性的样品，要用微生物学方法进行再确认。

● 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. 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。
区域 2: 检测样品的制备。
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。
4. 使用本制品获得的结果是以 Real Time PCR 仪的分析为基础来判定的。如果 Real Time PCR 仪的任何一功能出现问题都可能导致错误的判定结果，因此，要依据仪器说明书来正确设置 Real Time PCR 仪。

● 操作流程

1. 样品制备

从菌体培养液中制备热抽提样品。

2. Real Time PCR 仪的设定。

3. 反应液的配制及开始反应。

配制反应液

↓

将反应液分装到 microtube 中，添加阴性对照、检测样品或阳性对照。

↓

将 microtube 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

A. 样品的制备（在区域2进行）

[细菌粗提样品的制备]

1) 向1.5 ml Tube管中加入10 μl菌液。

2) 加入90 μl灭菌水后均匀混合。

3) 95°C，热处理5 min。

4) 12,000 rpm，4°C离心10 min后，回收上清。取5 μl上清用于PCR反应。

*用此方法制备的样品进行PCR反应时，如果对PCR反应有阻害作用，请使用灭菌水稀释10倍、100倍后再进行PCR反应。

*从食品样品中制备细菌培养液参照标准方法操作。

*粗提样品可以在-20°C保存。

B. 反应液的配制

本制品可在同一microtube中对*invA*基因和内参照基因同时进行扩增检测。为了得到正确的检测结果，应该同时进行*invA*基因阳性对照反应（SIN Positive Control）和阴性对照反应（灭菌水）。

1) 按下列组份配制PCR反应液（在区域1进行）。

将下列组份除模板外配成混合液后，向每个microtube中添加20 μl混合液。其中一个microtube作为阴性对照加5 μl dH₂O后，盖紧盖。

microtube数：样品数+2管对照（阴性对照和阳性对照）

为了减少误差，建议每个样品做2管反应。

试剂	使用量	终浓度
2X Cycleave Reaction Mixture	12.5 μl	1 X
SIN Primer/Probe Mix (5X conc.)	5 μl	1 X
检测样品或SIN Positive Control或dH ₂ O	(5 μl)*	
dH ₂ O	2.5 μl	
Total	25 μl	

* 配制PCR反应液时不添加检测样品或阳性对照。

[注意] 不要直接用手触摸microtube表面，以免影响荧光信号的收集。

2) 样品(模板)的添加(在区域3进行)。

向除阴性对照以外的tube管中加入样品或SIN Positive Control, 盖紧盖。用小型离心机进行轻微离心, 放置于Real Time PCR仪上。

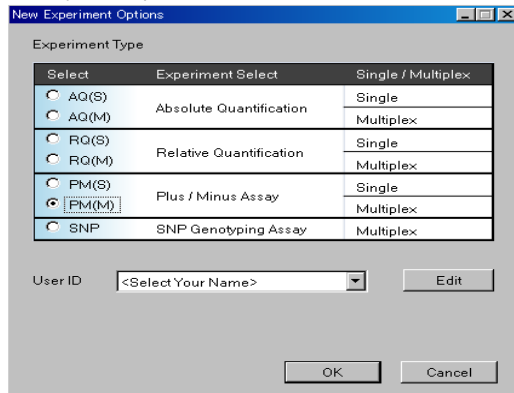
[注意] 反应混合液配置好后应于1小时内进行反应。

C. 使用Real Time PCR仪进行反应和结果判定(在区域3进行)。

各种Real Time PCR仪的操作方法有所不同。详细操作方法请参照其说明书。以下介绍使用Thermal Cycler Dice Real Time System // 及7500 Fast Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) 时的操作方法及结果判定。

【使用Thermal Cycler Dice Real Time System //】

1) 创建一个新的运行文件, 在New Experiment Options窗口的Experiment Type栏中选择“Plus/Minus Assay Multiplex”。



2) 在Thermal Profile Setup界面下、Collect Data栏中选择“FAM”和“ROX”, 按以下PCR条件进行设定。

预变性 (Hold)

Cycle: 1

95°C 10 sec

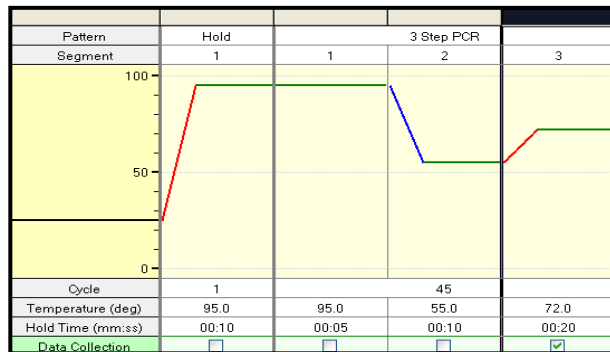
3 Step PCR

Cycle: 45

95°C 5 sec

55°C 10 sec

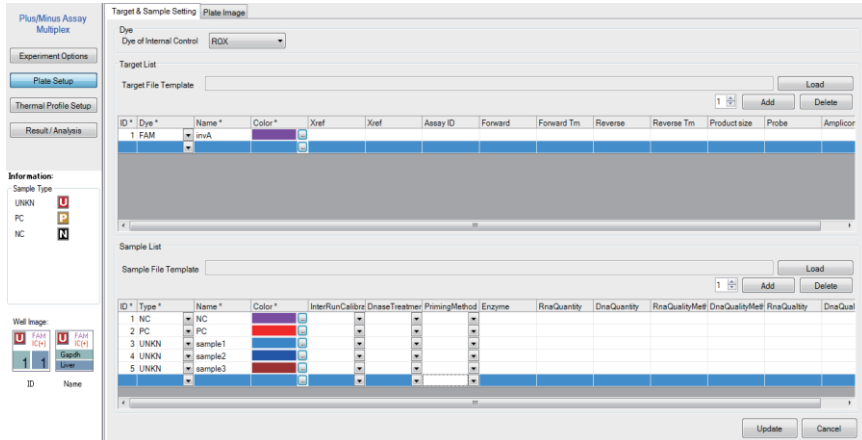
72°C 20 sec (检测)



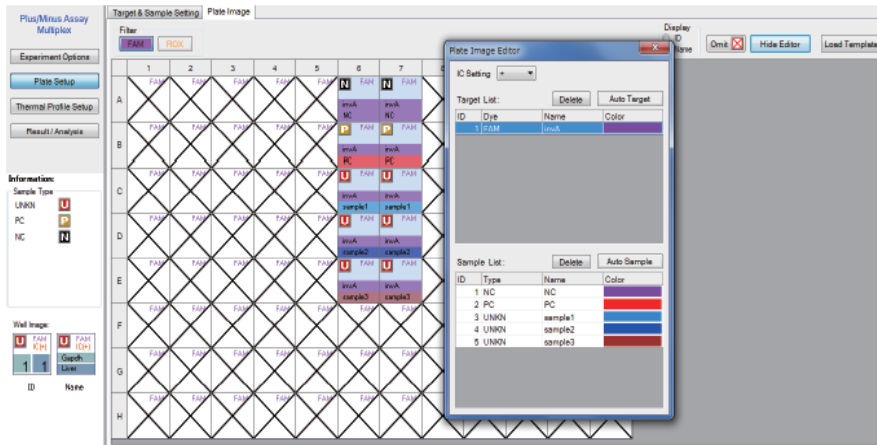
3) 点击画面右下方的“Start Run”键, 开始反应。



- 4) 在Plate Setup界面下设定样品信息。对于内参物进行“Dye”设置时选择“ROX”，输入样品信息后按“update”键。

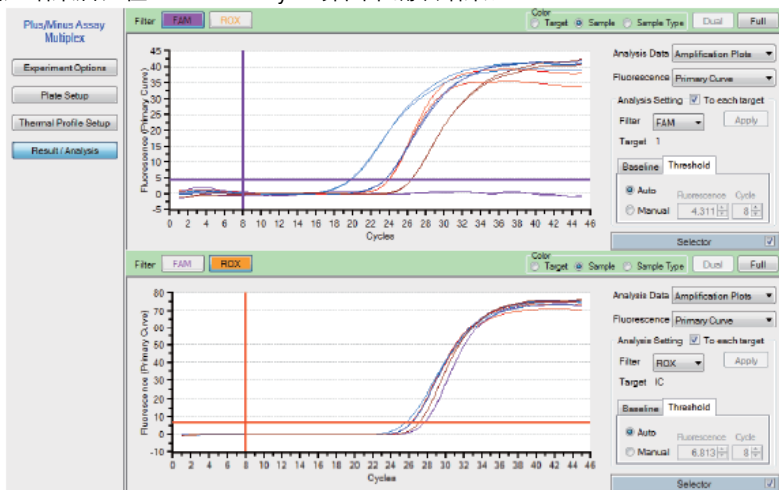


点击“plate Image”键后，选择待测物孔位，未占用孔位选择“omit”



- 5) 结果分析。

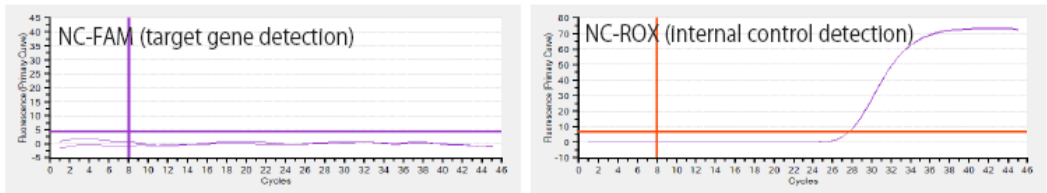
1. 反应结束后，在Result/Analysis界面下确认结果。



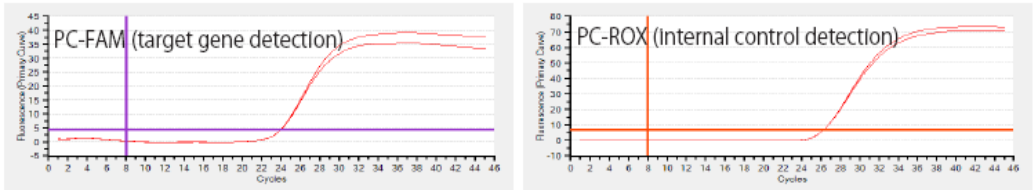
上图是目的基因在FAM 通道中检出的扩增曲线，
下图是内参照在ROX 通道中检出的扩增曲线（阈值设定为“Auto”）

2. NC (Negative Control) 及PC (Positive Control) 扩增曲线确认。

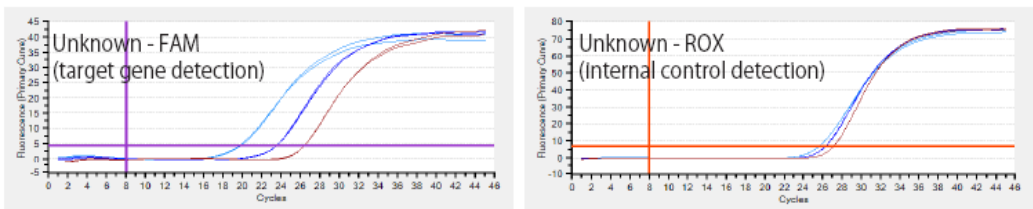
阴性对照在FAM通道中检出得到一条基线（荧光信号值不变化），且此基线的荧光信号值不能超过阈值。如果得到的基线的荧光信号值超过阈值时，请选择Threshold的Manual键，输入某数值，使基线的荧光信号值不超过阈值，同时在ROX通道中应得到超过阈值的一条扩增曲线。



确保阳性对照在FAM通道和ROX通道都应得到一条超过阈值的扩增曲线。



3. 在“selector”处选择“U”显示结果。确保FAM和ROX Filter通道中基线或扩增曲线的绘制是正常的。



4. 在Analysis Data栏选择“Plate Format”。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A						OK	OK					
B						OK	OK					
C						Posi	Posi					
D						Posi	Posi					
E						Posi	Posi					
F												
G												
H												

关于Negative Control “N”（阴性对照）、Positive Control “P”（阳性对照）的结果表示：

OK：对照反应正常（表示反应正常进行）。

OUT：对照反应异常（表示反应没有正常进行）。

Unknown “U” 检测样品的结果表示：

Posi：各目的基因为阳性。

Nega：各目的基因在检测界限以下。

ND：Internal Control、各目的基因都没能检测到，不能判定结果。

（表示反应或检测进行不顺利）。

ERROR：错误（表示检测样品平行样判定结果不一致）。

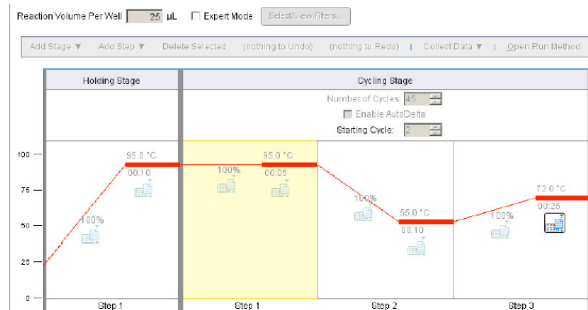
◆ 关于判定结果的注意事项

- 如果在阴性对照反应中，FAM通道在Amplification Plots、Primary Curve的设定中得到扩增曲线时（在Plate Format中显示为OUT）：
→可能有污染。请排除反应液配制场所及使用机器的污染后，再次反应。
- 如果在阳性对照反应中，FAM通道和ROX通道在Amplification Plots、Primary Curve的设定中得不到扩增曲线（在Plate Format中显示为OUT）：
→因某种原因导致PCR反应或Cycling Probe的检出异常。请再次反应。
- 在阳性对照反应的ROX通道下有荧光信号检出，在FAM通道下无荧光信号检出。（在PlateFormat中显示为OUT）：
→SIN Primer/Probe Mix有问题或阳性对照模板有可能降解。
- 在检测样品的反应中，FAM通道和ROX通道在Amplification Plots、Primary Curve的设定时都得不到扩增曲线（在PlateFormat中显示为ND）：
→因某种原因导致PCR反应或Cycling Probe检出异常。请再次反应。
样品中可能混有反应抑制物质，将样品进行稀释或重新制备后再次反应。
- 检测样品在FAM通道有扩增曲线，在ROX通道无扩增曲线：
→当目的基因DNA量添加多时，PCR反应会优先进行目的基因的扩增，竞争抑制内参照的扩增反应，这时判定为目的基因阳性，在Plate Format中显示为Posi。

【使用ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)】

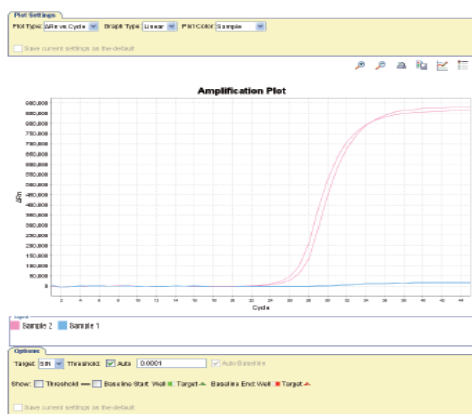
- 1) 点击“Advanced setup”开始一个新检测程序。
- 2) 在“Experiment Properties,” 选择“Quantification-Standard Curve”和“TaqMan Reagents”或“Other”。
(如果选择“Other”，需要再选择“Include Melt Curve”)
- 3) 在“Plate Setup”处点击“Define Target”，分别设定“Target Name”为“SIN”，“Reporter”为“FAM”，以及“Quencher”为“None”。
- 4) 在“Plate Setup”处点击“Define Target”，分别设定“Target Name”为“IC”，“Reporter”为“ROX”，以及“Quencher”为“None”。
- 5) 在“Define Samples”处输入阴性对照、阳性对照、样品名称。
- 6) 将上述2)、3)、4) 作成的Detector用“Add>>”按钮添加到Detector in Document中。Passive Reference选择none。
- 7) 点击Instrument键，输入以下反应条件：

Stage 1: 预变性
Reps: 1
95°C 10 sec
Stage 2: PCR反应
Reps: 45
95°C 5 sec
55°C 10 sec
72°C 25 sec (检测)

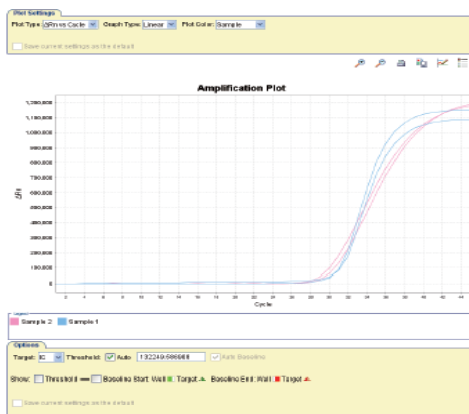


- 8) 将microtube放入仪器，点击Start键。

9) 反应结束后在Analysis界面Amplification Plot中确认扩增曲线。



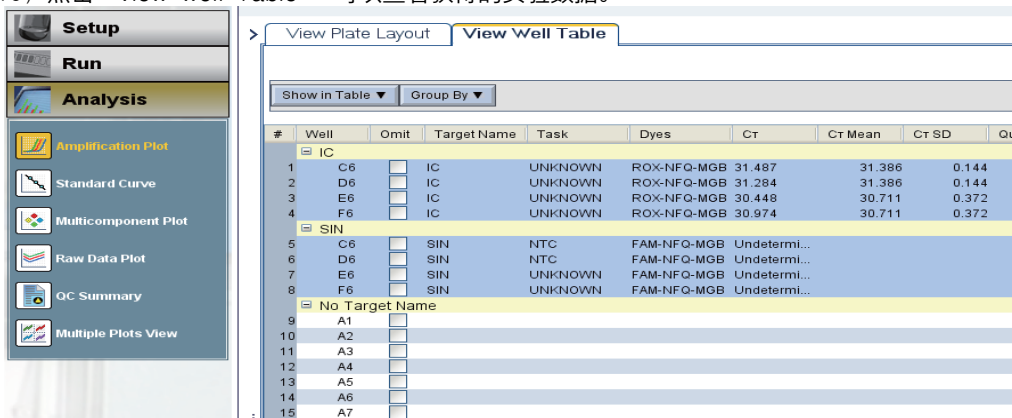
SIN目的基因检出 (FAM)



内参照检出 (ROX)

*必要时需手动设置“基线”和“阈值”

10) 点击“view well Table” 可以查看获得的实验数据。



* 上述操作同样适用于StepOnePlus Real-Time PCR，但是，针对ROX的检测灵敏度可能较低，当目的基因出现扩增时，ROX也可能同时出现一定程度的扩增，因此需要分别分析 FAM和ROX通道。

● 结果分析

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

		ROX (内参照)	
		(+)	(-)
FAM (<i>invA</i> 基因)	(+)	<i>invA</i> 基因阳性*1	<i>invA</i> 基因阳性*1
	(-)	<i>invA</i> 基因在检出界限以下*2	不能判定*3

判定结果表2：Positive Control (添加SIN Positive Control)

		ROX (内参照)	
		(+)	(-)
FAM (<i>invA</i> 基因)	(+)	<i>invA</i> 基因检出体系正常	<i>invA</i> 基因检出体系正常
	(-)	<i>invA</i> 基因检出体系有问题*4	不能判定*3

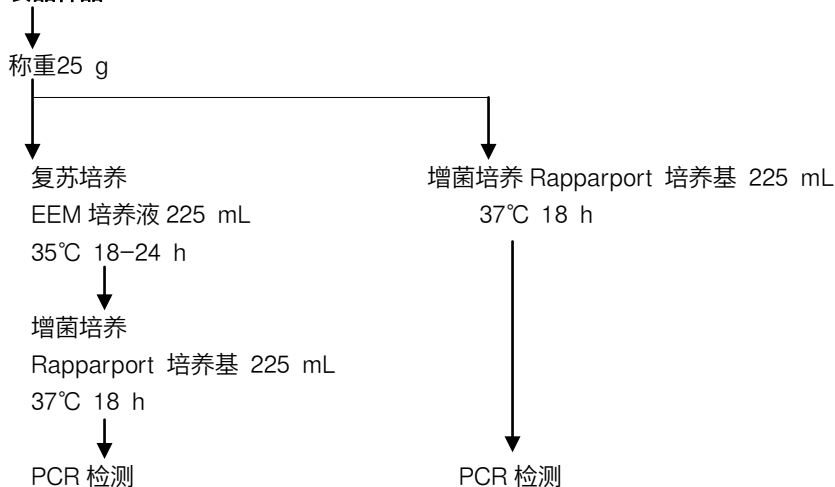
判定结果表3: Negative Control (添加灭菌水)

	扩增	ROX (内参照)	
		(+)	(-)
FAM (<i>invA</i> 基因)	(+)	<i>invA</i> 基因检出体系有污染*5	<i>invA</i> 基因检出体系有污染*5
	(-)	<i>invA</i> 基因检出体系无问题	不能判定*3

- *1: 不管内参照的ROX信号是 (+) 或 (-), 都判定为SIN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 (+), 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: SIN Primer/Probe Mix 有问题或SIN Positive Control 降解。
- *5: 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。

● 应用于食品检测的实验例

食品样品



● 参考文献

- 1) Saiki R, *et al* . *Science* . (1985) **37**: 170-172.
- 2) Galan J E, *et al* . *J Bacteriol* . (1992) **174**: 4338-4349.
- 3) Ashok K, *et al* . *Microb Pathog* . (1994) **19**: 85-95.

● 关联产品

- Thermal Cycler Dice™ Real Time System // (Code No. TP900/TP960)
- 96 well Hi-Plate for Real Time (Code No. NJ400)
- Sealing Film for Real Time (Code No. NJ500)
- Plate Sealing Pads (Code No. 9090)
- 0.2 ml Hi-8-tube (Code No. NJ300)
- 0.2 ml Hi-8-Flat Cap (Code No. NJ302)
- 0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (Code No. NJ600)

TaKaRa EX Taq is a registered trademark of Takara Bio Inc.
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: <http://www.takarabiomed.com.cn>