

Code No. CY240/CY240S

研究用

Takara

CycleavePCR™ *Legionella*
(16S rRNA) Detection Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	2
● 试剂盒外所需主要试剂、仪器及器具	2
● 使用注意事项	3
● 可检出菌种	3
● 操作注意事项	5
● 16S Positive Control 进行定量解析	6
● 操作流程	7
● 补充：关于区域划分	13
● 参考文献	13
● 关联产品	14

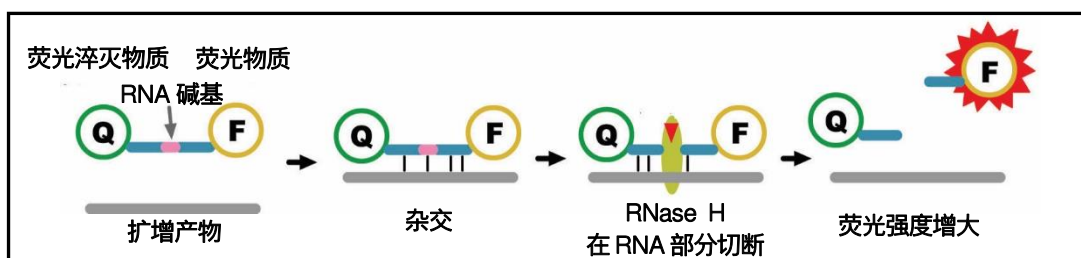
● 制品说明

Legionella pneumophila 为代表的军团菌属细菌是好氧型革兰氏阴性菌，广泛分布于土壤和淡水中，冷却水塔，循环式水浴槽、温泉等环境水中也存在。通过空气传播经呼吸道吸入人体后引起军团菌症。目前，被发现的军团菌有 61 种以上，这些种类的军团菌都可能引起军团菌症。但从军团菌症患者和环境水检测结果看，*Legionella pneumophila* 检出率最高。荧光定量 PCR 方法由于具有简便性、快速性和反应特异性高等特点，近年来在环境健康的监控和分析中得到了广泛的应用。

本制品是通过 Cycling Probe 的荧光定量方法广谱地检测军团菌属 16S rRNA 基因的试剂盒。制品中使用了 Hot Start 法用 DNA 聚合酶 *TaKaRa Ex Taq*[®] HS，可以有效地抑制在配制反应液时发生的引物错配及引物二聚体引起的非特异性 PCR 扩增，大大提高了 PCR 的检测灵敏度。

本制品采用 Cycling Probe 法进行检测，Cycling Probe 法是由 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。

制品中检测军团菌 16S rRNA 基因的探针荧光物质使用了 FAM 标记，内参照 (Internal Control) 检测用探针的荧光物质使用了 ROX 标记。在同一反应管内可以对 16S rRNA 基因及内参照同时进行扩增，通过两种不同荧光标记的探针可以对 16S rRNA 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。本检测无需电泳，简单快速，灵敏度高，特异性好。



Cycling Probe 法技术原理图

● 制品内容 (CY240: 25 μ l 反应 \times 50 次量; CY240S: 25 μ l 反应 \times 25 次量)

	CY240	CY240S
1. 2 \times Cycleave Reaction Mixture (2 \times conc.)	625 μ l	313 μ l
2. 16S Primer/Probe Mix (FAM、ROX) ^{*1} (5 \times conc.)	250 μ l	125 μ l
3. Solution E (10 \times conc.)	125 μ l	63 μ l
4. 16S Positive Control ^{*2} (1 \times 10 ⁶ copies/ μ l)	100 μ l	50 μ l
5. EASY Dilution (for Real Time PCR) ^{*2}	1 ml \times 2	1 ml

*1 荧光标记探针应避免保存。

*2 如果 PCR 组份 (1-3) 中混入 16S Positive Control，则不能进行准确的 PCR 检测。开封后，将组份 (1-3) 移至附带的盒中分开保存。

【制品组份说明】

2 \times Cycleave Reaction Mixture:

Real Time PCR 反应时所用试剂，含有酶、Buffer、dNTP Mixture。

16S Primer/Probe Mix:

是含有内参照 DNA 的引物/探针混合液。使用引物可对目的基因和内参照分别进行扩增。军团菌的 16S rRNA 检测用探针由 FAM 标记、内参照检测用探针由 ROX 标记。

目的基因序列:

基因组中特定的基因序列，本制品的目的基因是 16S rRNA 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 反应无阻害, 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。

Solution E:

可以减轻菌体来源的杂质等对 PCR 反应的阻害性。

16S Positive Control:

检测军团菌来源的 16S rRNA 基因时的阳性对照。

EASY Dilution (for Real Time PCR):

制作标准曲线时梯度稀释 DNA 标准品的稀释液。模板 DNA 如果用灭菌水或 TE Buffer 稀释时, 由于受 Microtube 吸附作用等的影响, 往往不能准确稀释, 导致实验结果精度降低。使用本制品时, 即使稀释至低浓度也能够进行准确地稀释。本制品中不含 tRNA 和 rRNA, 因此不会发生因 tRNA 和 rRNA 导致的非特异性扩增。

● 保 存: -20°C

● 试剂盒外所需主要试剂、仪器及器具

【样品的浓缩】

47 mm 膜过滤器支架

膜过滤器

-直径 47 mm、孔径 0.22 μm; Millipore 公司制造 Code GTTP04700、Isopore 膜过滤器等
过滤瓶

真空泵

镊子

50 ml 灭菌锥形管

2.0 ml microtube

【DNA 提取】

Column 精制时

-NucleoSpin Tissue XS (Code No. 740901.10/.50/.250)

-特级乙醇 (>99%)

-Heat block (可 56°C 和 70°C 设定)

简易抽提时

-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 仪】

Thermal Cycler Dice™ Real Time System IV with PC (Code No. TP1010)

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

Thermal Cycler Dice Real Time system II (Code No. TP900/TP960: 终卖)

Thermal Cycler Dice Real Time system Lite (Code No. TP700/TP760: 终卖)

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific), etc.

【各步操作通用】

Heat block

桌面小型离心机

振荡器

微量高速冷却离心机

移液枪及配套枪头 (带有疏水滤膜)

● 使用注意事项

下面是使用本制品时的注意事项，使用前请务必阅读。

1. 使用目的：本制品是用于环境分析的制品。
2. 检测结果：本制品用于基因检测，即使是死菌也可检测出来。*此外，如果设计的 Primer/Probe 序列中出现基因突变或缺失/插入，则可能无法检测到。(检测结果发生问题时，本公司概不负责。)

*：LC EMA-qPCR 技术也可用于选择性检测军团菌活菌 DNA。详情请访问本公司网站 (<https://www.takarabiomed.com.cn/>)

建议在培养法检测的基础上进行综合性结果判定。
3. 废弃：河流等环境中的采取的检测样品中除原虫外，还存在着细菌及病毒等的污染，反应前怀疑有污染时，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℃、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。试剂废弃时，请用大量流水冲洗。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。

● 可检出菌种

1. 使用本制品对以下军团菌的检出确认见下表。

	ID-No	Species	Serogroup	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	Detection
1	NIIB0145	<i>L. adalaidensis</i>		E	1762-AUS-E	49625	++
2	NIIB0040	<i>L. anisa</i>		E	WA-316-C3	35292	++
3	NIIB0405	<i>L. beliardensis</i>		E	Montbeliard A1	700512	++
4	NIIB0057	<i>L. birminghamensis</i>		C	1407-AL-H	43702	++
5	NIIB0009	<i>L. bozemanii</i>	1	C	WIGA	33217	++
6	NIIB0687	<i>L. bozemanii</i>	2	C	Tronto-3	35545	++
7	NIIB0114	<i>L. brunensis</i>		E	441-1	43878	++
8	NIIB1254	<i>L. busanensis</i>		E	KCTC 12084, K9951	700510	+
9	NIIB0047	<i>L. cherrii</i>		E	ORW	35252	(+)
10	NIIB0113	<i>L. cincinnatiensis</i>		C	72-OH-H	43753	++
11	NIIB0417	<i>L. donaldsonii</i>		C	MDA 2706	BAA-693	++
12	NIIB0406	<i>L. drozanskii</i>		E	LLAP-1	700990	+
13	NIIB0078	<i>L. dumoffii</i>		E	NY 23	33279	++
14	NIIB0049	<i>L. erythra</i>	1	E	SE-32A-C8	35303	++
15	NIIB0146	<i>L. fairfieldensis</i>		E	1725-AUS-E	49588	+
16	NIIB0408	<i>L. fallonii</i>		E	LLAP-10	700992	++
17	NIIB0688	<i>L. feeleii</i>	1	E	WO-44C	35072	+
18	NIIB0689	<i>L. feeleii</i>	2	C	691-WI-H	35849	+
19	NIIB0193	<i>L. geestiana</i>		E	1308	49504	+
20	NIIB0234	<i>L. gormanii</i>		E	LS-13	33297	++
21	NIIB0147	<i>L. gratiana</i>		E	Lyon 8420412	49413	++
22	NIIB0404	<i>L. gresilensis</i>		E	Gréoux 11D13	700509	+
23	NIIB0690	<i>L. hackeliae</i>	1	C	Lansing 2	35250	++
24	NIIB0691	<i>L. hackeliae</i>	2	C	798-PA-H	35999	+
25	NIIB0053	<i>L. israelensis</i>		E	Bercovier 4	43119	+
26	NIIB0046	<i>L. jamestowniensis</i>		E	JA-26-G1-E2	35298	++
27	NIIB0014	<i>L. jordanis</i>		E	BL-540	33623	++
28	NIIB0148	<i>L. lansingensis</i>		C	1677-MI-H	49751	+
29	NIIB0194	<i>L. londiniensis</i>	1	E	1477	49505	+

	ID-No	Species	Serogroup	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	Detection
30	NIIB1255	<i>L. londiniensis</i>	2	E	Mulhouse B26	BAA-518	+
31	NIIB0692	<i>L. longbeachae</i>	1	C	Long Beach 4	33462	++
32	NIIB0693	<i>L. longbeachae</i>	2	C	Tucker 1	33484	++
33	NIIB0045	<i>L. maceachernii</i>		E	PX-1-G2-E2	35300	++
34	NIIB0008	<i>L. micdadei</i>		C	TATLOCK	33218	++
35	NIIB0116	<i>L. moravica</i>		E	316-36	43877	++
36	NIIB0195	<i>L. nautarum</i>		E	1224	49506	+
37	NIIB0036	<i>L. oakridgensis</i>		E	OR-10	33761	(+)
38	NIIB0042	<i>L. parisiensis</i>		E	PF-209C-C2	35299	++
39	NIIB0033	<i>L. pneumophila</i>	7	E	Chicago 8	33823	++
40	NIIB0451	<i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-192		++
41	NIIB0453	<i>L. pneumophila</i>	10	E	H13-206		++
42	NIIB0462	<i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-239		++
43	NIIB0004	<i>L. pneumophila subsp. fraseri</i>	4	C	Los Angeles-1	33156	++
44	NIIB0005	<i>L. pneumophila subsp. fraseri</i>	5	E	Dallas 1E	33216	++
45	NIIB0063	<i>L. pneumophila subsp. fraseri</i>	15	C	Lansing 3	35251	++
46	NIIB0150	<i>L. pneumophila subsp. pascullei</i>	5	E	U8W	33737	++
47	NIIB0001	<i>L. pneumophila subsp. pneumophila</i>	1	C	Philadelphia-1	33152	++
48	NIIB0002	<i>L. pneumophila subsp. pneumophila</i>	2	C	Togus-1	33154	++
49	NIIB0003	<i>L. pneumophila subsp. pneumophila</i>	3	E	Bloomington-2	33155	++
50	NIIB0006	<i>L. pneumophila subsp. pneumophila</i>	6	C	Chicago 2	33215	++
51	NIIB0034	<i>L. pneumophila subsp. pneumophila</i>	8	C	Concord 3	35096	++
52	NIIB0050	<i>L. pneumophila subsp. pneumophila</i>	10	C	Leiden 1	43283	++
53	NIIB0051	<i>L. pneumophila subsp. pneumophila</i>	11	C	797-PA-H	43130	++
54	NIIB0060	<i>L. pneumophila subsp. pneumophila</i>	12	C	570-CO-H	43290	++
55	NIIB0061	<i>L. pneumophila subsp. pneumophila</i>	13	C	82A3105	43736	++
56	NIIB0062	<i>L. pneumophila subsp. pneumophila</i>	14	C	1169-MN-H	43703	++
57	NIIB0304	<i>L. pneumophila subsp. pneumophila</i>	9	E	IN-23-G1-C2	35289	++
58	NIIB0196	<i>L. quateirensis</i>		E	1335	49507	++
59	NIIB0260	<i>L. quinlivanii</i>	2	E	LC870	BAA-538	+
60	NIIB0407	<i>L. rowbothamii</i>		E	LLAP-6	700991	++
61	NIIB0048	<i>L. rubrilucens</i>		E	WA-270A-C2	35304	++
62	NIIB0039	<i>L. sainthelensi</i>	1	E	Mt St Helens 4	35248	++
63	NIIB0207	<i>L. sainthelensi</i>	2	C	Ly176.97	700517	++
64	NIIB0409	<i>L. santicrucis</i>		E	SC-63-C7	35301	++
65	NIIB0149	<i>L. shakespearei</i>		E	214	49655	++
66	NIIB0043	<i>L. spiritensis</i>	1	E	Mt St Helens 9	35249	++

67	NIIB0261	<i>L. spiritensis</i>	2	E	ML76	BAA-537	++
68	NIIB0041	<i>L. steigerwaltii</i>		E	SC-18-C9	35302	+
69	NIIB0262	<i>L. taurinensis</i>		E	Turin I no 1	700508	++
70	NIIB0117	<i>L. tucsonensis</i>		C	1087-AZ-H	49180	++
71	NIIB0032	<i>L. wadsworthii</i>		C	81-716A	33877	++
72	NIIB0206	<i>L. waltersii</i>		E	2074-AUS-E	51914	++
73	NIIB0197	<i>L. worsleiensis</i>		E	1347	49508	++
74	NIIB0305	<i>Legionella genomospecies 1</i>		E	2055-AUS-E	51913	+

方法：对各军团菌菌株的纯培养菌，使用 NucleoSpin Tissue XS 进行 DNA 提取后，分别以 1 μ l (83~542 ng) DNA 提取液为模板利用本制品进行了 qPCR 反应。qPCR 的定量结果是对 DNA 使用量校正后以嗜肺军团菌平均收量进行相对比较。

检测结果：

- ++：与 *L. pneumophila* 同等效率检出的菌种
(*L. pneumophila* 为 100 时，检测菌定量值在 50 以上)
- +: 比 *L. pneumophila* 检出效率稍低的菌种
(*L. pneumophila* 为 100 时，检测菌定量值在 20 以上)
- (+): 难以检出的菌种
(*L. pneumophila* 为 100 时，检测菌定量值未满足 1)

2. 以下菌种已确认无交叉反应。

Shigella sonnei
Escherichia coli VT1/VT2
Escherichia coli VT2
Escherichia coli LT (LTEC)
Escherichia coli ST (ETEC)
Vibrio parahaemolyticus
Campylobacter jejuni
Salmonella enterica
Clostridium botulinum
Clostridium perfringens
Staphylococcus aureus
Yersinia enterocolitica
Listeria monocytogenes
Bacillus cereus

● 操作注意事项

1. Real Time PCR 仪的使用请按照各自的说明书进行操作。
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仪的任一Auto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。

● 使用16S Positive Control进行定量解析

试剂盒中附带的16S Positive Control是含有军团菌来源的16S rRNA基因的质粒DNA，根据OD₂₆₀值换算成拷贝数并调整至 1×10^6 copies/ μ l。将16S Positive Control用EASY Dilution (for Real Time PCR) 10倍梯度稀释后制作标准曲线，并根据标准曲线进行定量分析。

但是，因本制品是基因检测的试剂盒，同时也可检测出死菌的基因。准确计算活菌数时需结合细菌培养法检测。

<解析例>

源于日本厚生劳动科学研究经费（健康安全·危机管理对策综合研究事业）[关于公共浴场含军团菌的综合卫生管理研究] 2012年报告书。

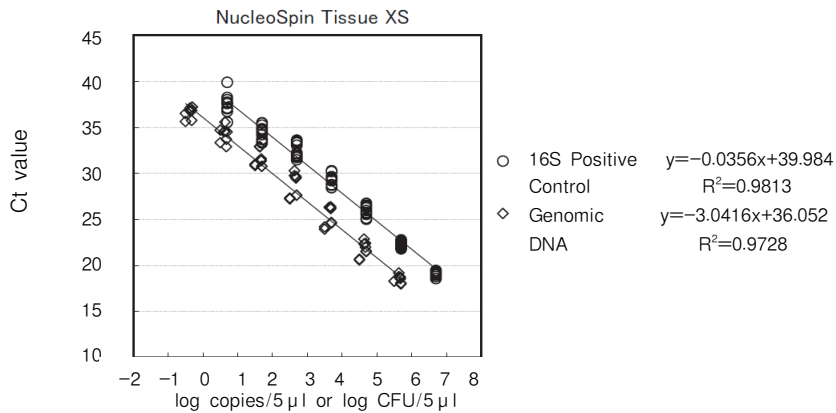


图 2. 使用 NucleoSpin Tissue XS 提取菌液 DNA 的标准曲线
(与 16S Positive Control 比较)

比较质粒 DNA (16S Positive Control) 和提取 DNA 的标准曲线，结果表明：二者斜率均为-3.04，呈平行关系、表明扩增效率无差异。二者 Y 轴交点的差值为 3.932 (质粒 DNA Y 轴交点 39.984-提取 DNA Y 轴交点 36.052 = 3.932)，因此，30°C 培养 4 天的菌株和变形虫培养菌的一个菌落 (1 CFU) 中获得的 16S rRNA 的量是以相当于 15 copies ($2^{3.932} = 15.3$) 的质粒 DNA (16S Positive Control) 来计算的 (考虑提取效率和反应效率)。

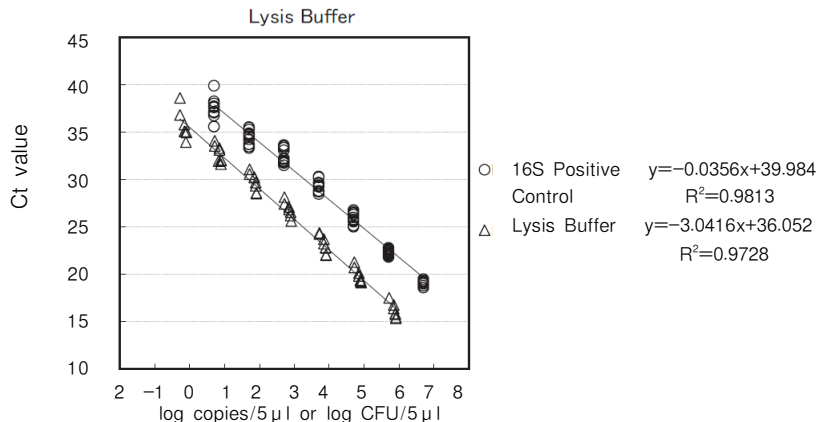


图 3. 使用 Lysis Buffer (Lysis Buffer for *Legionella*, Code No. 9181) 提取菌液 DNA 的标准曲线 (与 16S Positive Control 比较)

比较质粒 DNA (16S Positive Control.) 与提取 DNA 的标准曲线, 结果表明: 提取 DNA 斜率稍微偏高, 二者基本上呈平行关系、表明扩增效率无差异。二者的 Y 轴交点差值为 4.509(质粒 DNA Y 轴交点 39.984-提取 DNA 切片 Y 轴交点 35.475 =4.509), 因此 30°C 培养 4 天的菌株和变形虫培养菌的一个菌落 (1 CFU) 中获得的 16S rRNA 的量是以相当于 23 copies($2^{4.509}=22.8$) 的质粒 DNA (16S Positive Control.) 来计算的 (考虑提取效率和反应效率)。

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

【注意】

利用 Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (Code No. 7730) 进行 EMA 处理, 对军团菌的死菌 DNA 修饰后, 使用本试剂盒进行军团菌 16S rRNA 检测时, 根据纯培养菌的验证结果使用不同的计算方法。

详情请参照各制品的说明书。

● 操作流程

<使用 16S Positive Control 进行定量分析>

操作概要

1. 样品制备

2. 反应液的配制

将 16S Positive Control 梯度稀释后作为制作标准曲线的标准品



配制反应液



将反应液分装到反应管中, 添加阴性对照 (EASY Dilution)、标准曲线用标准品或检测样品。

3. 扩增及检测

将反应管放入 Real Time PCR 仪中, 开始反应。

4. 结果分析。

获得扩增曲线



反应结束



根据标准曲线可计算出检测样品的拷贝数



换算成菌数 (CFU)

A. 样品的制备 (在区域 2 进行)

下面是使用过滤浓缩法制备样品实验例

注意: Real Time PCR 检测十分灵敏, 因此要非常注意防止实验环境及实验使用器具的污染。

尽可能使用一次性实验器具。(盛水容器及过滤器支架等)

非一次性实验用品清洗后干热灭菌。(镊子等)

移液枪需另行准备。(配制 Real Time PCR 试剂和制备核酸样品时要分开使用)

【样品的浓缩】

(1) 在 47 mm 膜过滤器支架上安装直径为 47 mm、孔径为 0.22 μm 的膜过滤器。

(2) 将 500 ml 水样使用膜过滤器真空过滤。

(3) 真空过滤后, 用镊子将膜剥离后倒入 50 ml 灭菌锥形管中。

(4) 加入 5 ml 灭菌水, 振荡混合 1 分钟。

(5) 取 1 ml 混合液分装于 1.5 ml 反应管中。

(6) 4°C、13,000~15,000 rpm离心5分钟后, 按照DNA提取法将上清液弃除。

使用NucleoSpin Tissue XS (Cat. #740901.10/.50/.250)时

用移液枪缓慢吸除940 µl上清液, 剩余60 µl用于DNA提取。

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

用移液枪缓慢吸除975 µl上清液, 剩余25 µl用于DNA提取。

使用Lysis Buffer for Legionella (Code No. 9181)时

用移液枪缓慢吸除全部上清液。注意不要吸取沉淀物(可残留少量上清液)。

[DNA提取]

DNA提取可使用Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 (Code No. 9183)、Lysis Buffer for *Legionella* (Code No. 9181)的简易提取法和使用NucleoSpin Tissue XS (Code No. 740901.10/.50/.250)的Column精制法的2种方法。简易提取法因操作简便、提取效率高, 适用于经氯化物消毒的循环式水浴槽等污染少的样品。而Column精制法适用于泉水等含有PCR阻害物的样品。

注意: 实验操作时, 要戴一次性手套、口罩和护目镜, 在生物安全柜中操作。

使用NucleoSpin Tissue XS (Column精制法) 时

- (1) 在60 µl溶液中加入160 µl Lysis Buffer T1, 轻轻混合后轻微离心。
- (2) 再加入16 µl Proteinase K^{*1}, 振荡混合(5秒×2)后轻微离心。
- (3) 56°C孵育10分钟。
- (4) 轻微离心后加入160 µl Lysis Buffer B3, 振荡混合(5秒×2)后轻微离心。
- (5) 70°C孵育5分钟后振荡混合。
- (6) 将样品放置至室温, 轻微离心后加入160 µl 96~100%乙醇, 振荡混合(5秒×2)后轻微离心。
- (7) 将NucleoSpin Tissue XS Column置于2 ml Collection Tubes中。
- (8) 将(6)的溶液加入到Column中, 11,000×g离心1分钟。
- (9) 将Column置于新的2 ml Collection Tubes中。
- (10) 在Column中加入50 µl Wash Buffer B5^{*2}, 11,000×g离心1分钟。弃滤液, 将Column重新置于2 ml Collection Tube中。
- (11) 在Column中加入50 µl Wash Buffer B5^{*2}, 11,000×g离心2分钟。确认Column中无残留液体。
- (12) 将Column置于1.5 ml反应管中。
- (13) 在Column中加入25 µl Elution Buffer BE, 11,000×g离心1分钟, 回收DNA溶液。(第一次洗脱)
- (14) 重复操作(13)。(第二次洗脱)
- (15) 在50 µl回收液中取5 µl用于Real Time PCR。

*1: 使用Proteinase K: Code No. 740901.50 (50次量) 时:

在20 mg Proteinase K (冻干品) (1 vial) 中加入1 ml Proteinase Buffer 后溶解。
溶解后的Proteinase K溶液可-20°C保存。

*2: Wash Buffer B5: 2 ml Wash Buffer B5 (Concentrate) 中加入8 ml乙醇。

使用Lysis Buffer for Legionella Ver.2 (简易提取法) 时

※请按照说明书进行操作。

- (1) 在残留液25 µl中加入25 µl Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2, 振荡混合后轻微离心。
- (2) 95°C孵育10分钟。
- (3) 用振荡器轻轻混合后, 全量加入到Filter Column中。
- (4) 11,000 ×g离心1分钟。
- (5) 50 µl洗脱液作为DNA回收液。
- (6) 取5 µl回收液用于Real Time PCR。

使用Lysis Buffer for Legionella (简易提取法) 时

※请按照说明书进行操作。

- (1) 在沉淀物中加入50 μ l Lysis Buffer for *Legionella*, 振荡混合后轻微离心。
- (2) 95°C 孵育10分钟。
- (3) 用振荡器轻轻混合后, 4°C、15,000 rpm (速度上限) 离心10分钟。
- (4) 冰上静置5分钟。
- (5) 25 μ l 上清液作为DNA回收液。
- (6) 在25 μ l 回收液中取5 μ l 用于Real Time PCR。

B. Real Time PCR反应液的配制

使用本试剂盒可在同一个反应管中可对军团菌的16S rRNA基因和内参照DNA的扩增产物同时检出。为了得到正确的检测结果, 除检测样品外还应该同时进行标准品阳性对照反应和阴性对照反应。

(1) 梯度稀释16S Positive Control (在区域3进行)

使用EASY Dilution (for Real Time PCR)进行以下梯度稀释

(每个反应使用5 μ l, 建议进行n=2的平行反应)

1. 1×10^6 copies/ μ l (16S Positive Control原液)
2. 1×10^5 copies/ μ l (16S Positive Control原液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
3. 1×10^4 copies/ μ l (1×10^5 copies/ μ l溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
4. 1×10^3 copies/ μ l (1×10^4 copies/ μ l溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
5. 1×10^2 copies/ μ l (1×10^3 copies/ μ l溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
6. 10 copies/ μ l (1×10^2 copies/ μ l溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)

(2) 按下列组份在冰上配制PCR反应液 (在区域1进行)。

将下列组份除模板外配成所需管数^{*1}+ α 的混合液后, 向每个0.2 ml反应管中添加23 μ l混合液, 轻轻盖上盖子。其中一个反应管作为阴性对照加5 μ l EASY Dilution后, 盖紧盖子。

试剂	使用量	终浓度
2 \times Cycleave Reaction Mixture	12.5 μ l	1 \times
16S Primer/Probe Mix (5 \times conc.)	5 μ l	1 \times
检测样品或标准品或EASY Dilution	(5 μ l) ^{*3}	
Solution E	2.5 μ l	

* 3: 检测样品或16S Positive Control在区域3添加, 不在区域1添加。

(3) 模板的添加 (在区域3进行)。

向除阴性对照以外的反应管中分别加入5 μ l检测样品和梯度稀释的标准品, 盖紧盖子(不要直接用手触摸反应管表面, 以免影响荧光信号的收集)。用小型离心机进行轻微离心, 放置于Real Time PCR仪上。

C. 使用Real Time PCR仪进行扩增反应和结果判定 (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。

【使用Thermal Cycler Dice Real Time Systems】

PCR反应条件 ※ “Speed” 设定为 “Fast”

< Dice IV / III时 >

预变性 (Hold)

Cycle: 1

95°C 10 sec

3 step PCR

Cycle: 45

95°C 5 sec

55°C 20 sec

72°C 20 sec (检测)

< Dice II / Lite 时 (全部终卖) >

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)

检测通道

FAM

ROX

样品种类

阴性对照

样品种类: NTC (No Template Control)

标准品

样品种类: STD (标准品)

模板量: $5 \times 10 \sim 5 \times 10^6$ copies

检测样品

样品种类: UNKN (Unknown)

样品名	样品种类	模板量
Negative control	NTC	-
Control DNA	STD	5.00E+001(50 copies)
Control DNA	STD	5.00E+002(500 copies)
Control DNA	STD	5.00E+003(5,000 copies)
Control DNA	STD	5.00E+004(50,000 copies)
Control DNA	STD	5.00E+005(500,000 copies)
Control DNA	STD	5.00E+006(5,000,000 copies)
Sample · ·	UNKN	-

【使用Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)】

PCR反应条件

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 25 sec (检测)

Passive Reference

(none)

Define Targets

Target Name : 16S、Reporter : FAM、Quencher : (none)

Target Name : IC、Reporter : ROX、Quencher : (none)

Define Samples

阴性对照

样品种类: NTC (未添加模板的对照)

标准品

样品种类: STD (标准品)

模板量: $5 \times 10 \sim 5 \times 10^6$ copies

检测样品

样品种类: UNKN (Unknown)

※上述操作同样适用于StepOnePlus Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific)，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的扩增曲线会比较低，因此需

要分别分析FAM和ROX通道。

D. 定量分析

将Real Time PCR反应结果中获得的拷贝数利用下面的公式换算成菌数（CFU）。

但是，因本制品是基因检测的试剂盒，同时也可检测出死菌的基因。准确计算活菌数时，需结合细菌培养法检测。

1. 拷贝数换算成菌数（CFU）时

- 使用NucleoSpin Tissue XS（Column精制法）时：CFU=拷贝数 / 15
- 使用Lysis Buffer for *Legionella*（简易提取法）：CFU=拷贝数 / 23

2. 100 ml水样中的菌换算成菌数（CFU）时

按照A操作时：上述1中的拷贝数换算的菌数（CFU）相当于10 ml水样中的菌数。因此，不论使用哪一种DNA提取法，在1中获得的菌数乘以10即是100 ml水样中的菌数（CFU）。

※ 请参照使用16S Positive Control进行定量分析。

※ 对于Thermal Cycler Dice Real Time System系列，请在分析时关闭标准化校正。关于标准化校正的设定变更方法，请参照本公司网站。

<Optional: +/-判定>

+/-判定是判断目的基因是否是阳性、或者在检出界限以下。这种情况下无需使用标准品。

操作概要

1. 样品制备（参照第7页）。
2. 反应液的配制。

配制反应液



将反应液分装到 microtube 中，添加阴性对照（EASY Dilution）、检测样品或标准品（16S Positive Control）。

3. 扩增及检测

将 microtube 放入 Real Time PCR 仪中，开始反应。

4. 结果判定。

界面显示 Real Time PCR 扩增曲线



反应完成



结果判定

a. Real Time PCR反应液的配制

(1) 按下列组份在冰上配制PCR反应液（在区域1进行）。

将下列组份除模板外配成所需管数*1+α的混合液后，向每个0.2 ml反应管中添加20 μl混合液，轻轻盖上盖子。其中一个反应管作为阴性对照加5 μl EASY Dilution后，盖紧盖子。

（建议进行N=2以上的平行反应）

试剂	使用量	终浓度
2×Cycleave Reaction Mixture	12.5 μl	1×
16S Primer/Probe Mix (5×conc.)	5.0 μl	1×
检测样品或16S Positive Control或EASY Dilution	(5.0 μl)*4	
Solution E	2.5 μl	

* 4: 检测样品或Giardia Positive Control在区域3添加，不在区域1添加。

(2) 模板的添加（在区域3进行）。

向除阴性对照以外的反应管中分别加入5 μl检测样品和16S Positive Control，盖紧盖子（不要直接用手触摸反应管表面，以免影响荧光信号的收集）。用小型离心机轻微离心，放置于Real Time PCR仪上。

- b. 使用Real Time PCR仪进行扩增反应和结果判定（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。

【使用Thermal Cycler Dice Real Time System IV / III】

PCR反应条件 ※设定“Speed”为“Fast”

< Dice III时 >

预变性 (Hold)

Cycle: 1

95°C 10 sec

3 step PCR

Cycle: 45

95°C 5 sec

55°C 20 sec

72°C 20 sec (检测)

< Dice II / Lite时 >

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)

检测通道(不需要变更)

FAM

ROX

样品种类

阴性对照

样品种类: NC (Negative Control)

阳性对照

样品种类: PC (Positive Control)

检测样品

样品种类: UNKN (Unknown)

※分析结果时，请关闭标准化校正。关于标准化校正的设定变更方法，请参照本公司网站。

- c. 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）。

	扩增信号	ROX (内参照)	
		(+)	(-)
FAM	(+)	16S rRNA基因阳性*5	16S rRNA基因阳性*5
(16S rRNA)	(-)	16S rRNA基因在检出界限以下*6	不能判定*7

判定结果表2: Positive Control (添加16S Positive Control)

	扩增信号	ROX (内参照)	
		(+)	(-)
FAM	(+)	16S rRNA基因检出体系正常	16S rRNA基因检出体系正常
(16S rRNA)	(-)	16S rRNA基因检出体系有问题*8	不能判定*7

判定结果表3: Negative Control (添加 EASY Dilution)

	扩增信号	ROX (内参照)	
		(+)	(-)
FAM	(+)	检出体系有污染*9	检出体系有污染*9
(16S rRNA)	(-)	检出体系无污染	不能判定*7

*5: 不管内参照的ROX信号是 (+) 或 (-)，都判定为16S rRNA基因阳性。从Negative Control

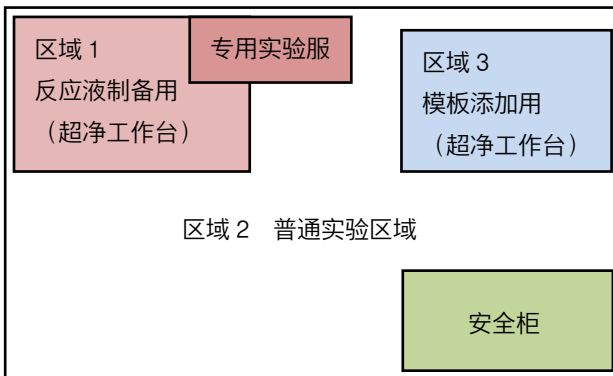
的反应结果来判定反应有无污染。

- *6: 如果同时Positive Control反应信号是(+)，则可确定反应体系正常。
- *7: 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。
- *8: 16S Primer/Probe Mix有问题或16S Positive Control降解。
- *9: 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。

Troubleshooting

- 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：
→可能有目的产物的污染。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：
→因某种原因导致PCR反应或Cycling Probe的检出异常。确认反应液配制有无错误后请再次反应。
- 在标准品和阳性对照反应的ROX通道下有荧光信号检出，在FAM通道下无荧光信号检出。
→16S 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：
→样品中可能混有反应阻害物质，将样品进行稀释或重新制备后再次反应。
- 在检测样品的反应中，FAM通道在Amplification Plots、Primary Curve的设定时得到扩增曲线，ROX通道下没有荧光信号检出：
→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的检测正常，目的基因为阳性。

● 补充：关于区域划分



区域 1: 只进行反应试剂、Real Time PCR 反应液的配制及分装 (无模板操作区)。

区域 2: 普通实验区域

进行样品处理及 DNA 制备。根据需要设置安全柜。

区域 3: 高浓度 DNA 操作区域

在分装完成的反应液中添加模板 DNA, 标准品的稀释也在此区域进行。

● 参考文献

- 1) Fields B S, Benson R F, and Besser R E. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev.* (2002) **15**:506–526.
- 2) Benin A I, Benson R F, and Besser R E. Trends in Legionnaires' disease, 1980–1988: declining mortality and new patterns of diagnosis. *Clin Infect Dis.* (2002) **35**:1039–1046.
- 3) 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, 2012 allotment research report (Japanese).
- 4) Legionnaire's Disease Prevention Guidelines, 3rd Edition (Publisher: Building Management Education Center) (Japanese).

● 关联产品

NucleoSpin Tissue XS (Code No. 740901.10/.50/.250)

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

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

Thermal Cycler Dice™ Real Time System IV with PC (Code No. TP1010)

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

【军团菌活菌检测方法 (LC EMA-qPCR方法)】

Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (Code No. 7730)

Legionella LC Medium Base Ver.2 (Code No. 9017)

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

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

【水质检测】

Cycleave RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit (Code No. CY230)

Cycleave RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit (Code No. CY231)

TaKaRa Ex Taq is a registered trademarks of Takara Bio Inc.

CycleavePCR, and Thermal Cycler Dice are trademark 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.takarabio.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>