

Code No. RR102A

研究用

Takara

O-157 (Verocytotoxin Genes)
One Shot PCR Screening Kit Ver.2

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒外必备材料	1
● 使用前的注意事项	2
● 操作注意事项	2
● 试剂盒原理	2
● 操作流程	3
● 结果判定	4
● 补充：关于区域划分	4
● 实验例	6
● 关联产品	6
● 参考文献	7

● 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)。本制品是利用 PCR 技术特异性检出 Vero 毒素基因, 可快速简单地检出 EHEC 的 One Shot PCR Kit。PCR 需要的全部试剂都分装在 0.2 ml PCR tube 中, 只需加入要检测的样品 DNA 就可以进行 PCR 反应。DNA 聚合酶使用了具有高扩增效率的 *TaKaRa Ex Taq*[®] HS, 可以在短时间内高灵敏度检出。为了防止反应阻害等原因产生的假阴性结果, 在反应体系中加入阳性对照模板 Control template EC3, 此模板扩增片段大小与 Vero 毒素基因扩增片段大小不同, 通过电泳对检出结果进行判定。

● 制品内容

2×One Shot PCR solution* (分装于无色的 0.2 ml PCR tube 中) 25 μl×48 tubes

* 2×One Shot PCR solution 含有以下成分:

1. PCR Primer EVC-1, 2
目的基因: 扩增以下肠出血性大肠杆菌 Vero 毒素基因 VT1、VT2、VT2vha、VT2vhb、VT2vpl。
扩增片段大小: 171 bp
2. Control template EC3
为了验证 PCR 反应是否正常进行, solution 中添加了阳性对照模板, 使用 Primer EVC-1,2 扩增此模板, 产物长度为 685 bp。
3. *TaKaRa Ex Taq* HS
TaKaRa Ex Taq HS 是抗 *Taq* 抗体与 *TaKaRa Ex Taq* 的混合物, 是可以进行 Hot Start 法 PCR 反应酶, 抗 *Taq* 抗体在反应加热到高温前与酶结合, 防止循环前由于引物错配或引物二聚体所产生的非特异性扩增。可有效检出 Vero 毒素基因。
4. *Ex Taq*[™] Buffer
5. dNTP Mixture

● 保 存

-20℃。

由于组分中含有 *TaKaRa Ex Taq* HS, 应避免剧烈混匀以及反复冻融。

● 试剂盒外必备材料

[试剂]

1. 灭菌水
2. 琼脂糖凝胶
PrimeGel[™] Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A)
3. 电泳缓冲液
Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50× Powder, pH8.3 (Code No. T9131)
TBE powder (Code No. T905)
4. Loading buffer (6×: 36%甘油, 0.05%溴酚蓝, 0.035%二甲苯胺, 30 mM EDTA), 此 buffer 附带于 Takara 的 DNA Marker 产品中。
5. DNA marker
pHY Marker (Code No. 3404A/B)
φX174-*Hinc* II digest (Code No. 3406A/B)
100 bp DNA ladder (Code No. 3407A/B)

6. DNA 染色剂
SYBR[®] Green I Nucleic Acid Gel Stain (Code No.5760A/5761A)
溴化乙锭

【材料】

1. 加热块 (温度可达 95°C)
2. 1.5 ml tube 适用的低温离心机
3. PCR 扩增仪
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (Code No. TP600)
4. 电泳装置
Mupid-2plus (Code No. AD110)
Mupid-exU (Code No. AD140)
5. 紫外线透射装置 (波长 300 nm)
6. 宝丽来凝胶成像系统
Mupid[®]-Scope WD (Code No. MS-WD)

【其他】

1. 1.5 ml 和 0.2 ml PCR tube [0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (Code No. NJ200)]
2. 20 μ l 和 200 μ l 的移液枪
3. 微量移液枪枪头
4. 琼脂糖凝胶染色托盘

● 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 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

使用 PCR 仪时请按照仪器说明书进行操作。

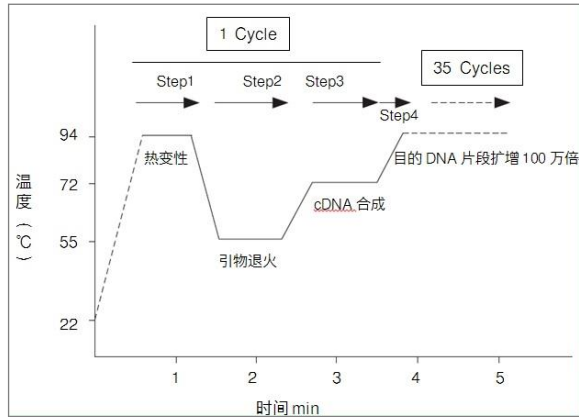
- 1) 如果引物受到核酸酶污染, 就无法进行分析。汗液或唾液中都含有核酸酶, 操作过程要戴口罩和手套。
- 2) 建议从反应液配制到检测按照下面 4 个区域进行分区操作, 操作区进行物理性隔离。为防止污染, 除在操作区 4 外请避免对 PCR 扩增产物 tube 进行开闭。
 - 操作区 1: 反应液的配制及分装。
 - 操作区 2: 检测样品的制备 (DNA 提取等)。
 - 操作区 3: 将检测样品添加到反应液中。。
 - 操作区 4: 电泳等检测 PCR 扩增产物。

● 试剂盒原理

PCR 方法 (Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链式反应)

PCR 技术是一种体外快速扩增特定 DNA 片段的方法,

由 DNA 链的热变性 (denaturation step)、引物退火 (annealing step)、延伸 (extension step) 组成一轮循环, 每一轮循环扩增的产物再作为下一轮的反应模板, 反复进行变性, 退火和聚合反应循环 (参照下图) 在短时间内 DNA 扩增能达到 100 万倍。



Step1: Primer, dNTP 和 Polymerase 的混合液 94°C高温变性 1 min, 双链模板 DNA 解链为两条单链 DNA。
 Step2: 55°C, 1 min 低温下退火, 引物与模板链 3' 端形成部分双链 DNA。
 Step3: 72°C, 1 min, 通过 DNA 聚合酶合成互补链 DNA。
 Step4: 扩增产物的双链 DNA 再次热变性为单链 DNA (返回 Step1)。
 Step1-4 作为一个循环, 重复 35 cycles。

● 操作流程

实验例: 热处理菌体的检出例

A. 热提取样品的制备 (在操作区 2 进行)

方法-1

1. 取 4 μl 富集培养液到 1.5 ml tube 或 2 μl 富集培养液到 0.2 ml PCR tube 中。
2. 分别加入 196 μl 和 98 μl 灭菌水到 1.5 ml tube 或 0.2 ml tube, 并混合均匀。
3. 95°C热处理 5 min。(使用 0.2 ml tube 时选择 Thermal Cycler 比较方便)
4. 12,000 rpm, 4°C离心 10 min, 回收上清。收集的上清液中的 25 μl 即为热提取样品。如果需要更高的灵敏度, 可以试试方法-2。

方法-2

1. 取 1 ml 富集培养液 (Novobiocin-supplemented medium etc) 到 1.5 ml tube 中。
2. 5,000 rpm, 4°C离心 5 min, 弃上清。
3. 加入 100 μl 的灭菌水到沉淀 (菌细胞) 中。
4. 95°C热处理 5 min。
5. 12,000 rpm, 4°C离心 5 min, 回收上清。收集的上清液中的 25 μl 即为热提取样品。

注意: 当使用方法-2 制备的样品抑制 PCR 反应时, 试试下面纯化的操作方法 (1) 或/和 (2)。

(1) 使用 PBS Buffer 将步骤 2 的沉淀清洗 2-3 次 (使用 500 μl PBS 悬浮沉淀, 离心, 弃上清; 如此重复 2-3 次)。

(2) 将制备的热提取样品使用灭菌水稀释 10 倍或 100 倍。然后取 25 μl 稀释液用于 PCR 反应。

※ 富集培养液依据每种样品的标准操作方法进行使用。热提取样品可以在-20°C保存。

B. PCR 反应

1. 取 25 μl 样品提取液加入到含 2×One Shot PCR solution 的 tube 中。(在操作区 3 进行)
用 25 μl 灭菌水代替样品作为阴性对照。(在操作区 1 进行)
2. 盖紧管盖, 然后置于热循环仪中, 按下列条件进行 PCR 反应。

94°C	1 min	}	35 cycles
55°C	1 min		
72°C	1 min		
72°C	10 min		

整个反应需要 2.5 小时，PCR 反应液可于 4°C 或 -20°C 保存。

C. 琼脂糖凝胶的制备

1. 在三角瓶中加入电泳用 buffer，缓慢加入 NuSieve3:1 Agarose 至浓度为 3% (w/v)，边搅拌边加入。
2. 微波炉加热 2-3 min，取出搅拌均匀确认溶解均匀，重复加热搅拌直到溶解均匀。
3. 准备胶板，插上梳子。
4. 待凝胶冷却到 (50-60°C) 时，把胶倒到胶板上，室温静置 30 分钟至 1 小时，使胶凝固。

*当使用溴乙锭对凝胶进行先染色时

待凝胶冷却到 (50-60°C) 时，加入终浓度是 0.5 μg/ml 的 EB 溶液，充分均匀再倒胶板。

5. 慢慢拔下梳子，注意不要把胶弄破。
6. 将凝胶放入电泳槽中，加入电泳缓冲液至完全没过胶面。

D. 凝胶电泳 (在操作区 4 进行)

1. 正负电极不要接错。(PCR 扩增产物带负电，按照 - → + 的方向移动)
2. PCR 反应结束后，取 10 μl 反应液与 2 μl 的 loading buffer 使用移液枪混匀，慢慢加到胶孔里。两端的胶孔加适量 Marker。
3. 50-150 V 的恒定电压，直到溴酚蓝*迁移到离胶孔 3-4 cm。
*溴酚蓝迁移较快。

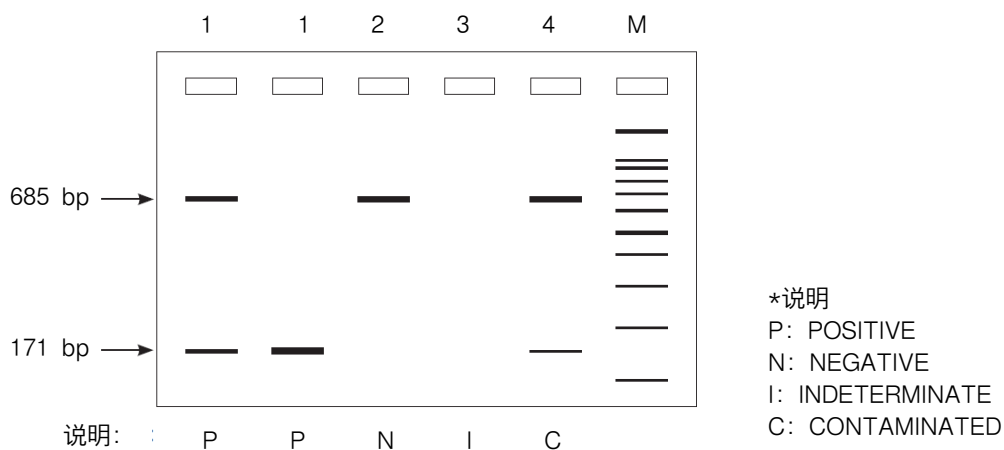
E. 染色片段的确认 (EB 先染色时只进行 3 就可以)

1. 制备 1 μg/ml 的 EB 水溶液，或 SYBR Green I 溶液 (用 TBE 缓冲液或电泳缓冲液稀释 10,000 倍)，调制量能完全没过凝胶的量，加入凝胶染色用容器中。
2. 将电泳后的凝胶放入容器中，静置 20-30 分钟。
3. 把凝胶放在 UV Transilluminator 上照相，与 DNA Marker 对比，确认 DNA 片段的有无。
注意：使用 EB、SYBR Green I 以及经过染色的凝胶时，必须戴手套，注意不要直接碰到液体。

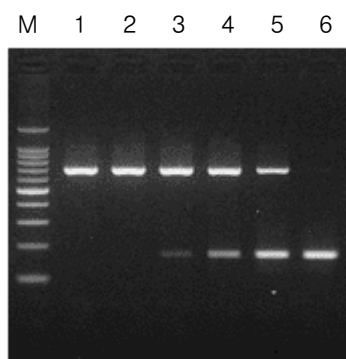
● 结果判定

检测样品中如果有 Vero 毒素基因存在，则可检出 171 bp 的扩增产物。Positive control (Control template) 中有 685 bp 的片段检出。

电泳结果	结果判定
(1) 检测到 171 bp 扩增产物。	不管 685 bp 片段有无，都判定 Vero 毒素基因检测阳性 (Vero 毒素基因量多时，positive control 有可能无扩增)
(2) 未检测到 171 bp 扩增产物，但检测到 685 bp 的扩增产物。	Vero 毒素基因在检出界限以下
(3) 没有检测到任何 PCR 扩增产物。	PCR 反应失败。可能是 PCR 操作失败或 PCR 试剂失活。需重新进行 PCR 反应。
(4) 阴性对照反应中检测到 171 bp 扩增条带。	PCR 反应体系污染。请在确保 PCR 反应体系不被污染的情况下再次进行 PCR 反应。

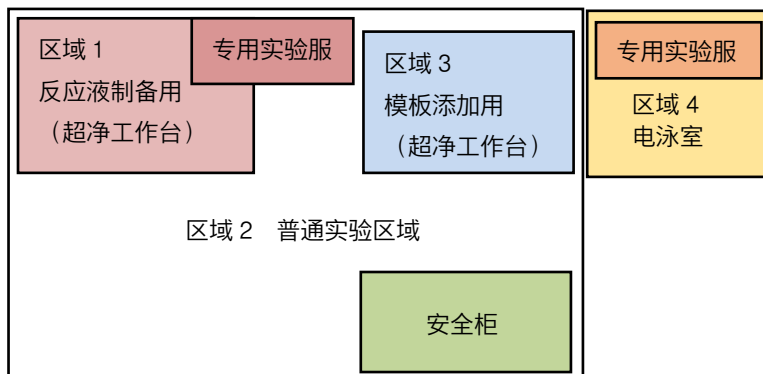


凝胶电泳结果:



Lane 1: Negative control
Lane 2: 10^0 cells/tube
Lane 3: 10^1 cells/tube
Lane 4: 10^2 cells/tube
Lane 5: 10^3 cells/tube
Lane 6: 10^4 cells/tube
Lane M: 100 bp DNA Ladder
3% NuSieve 3:1 Agarose (EtBr 先染色) 电泳

● 补充: 关于区域划分



区域 1: 只进行反应试剂、PCR 反应液的配制及分装 (无模板操作区)。

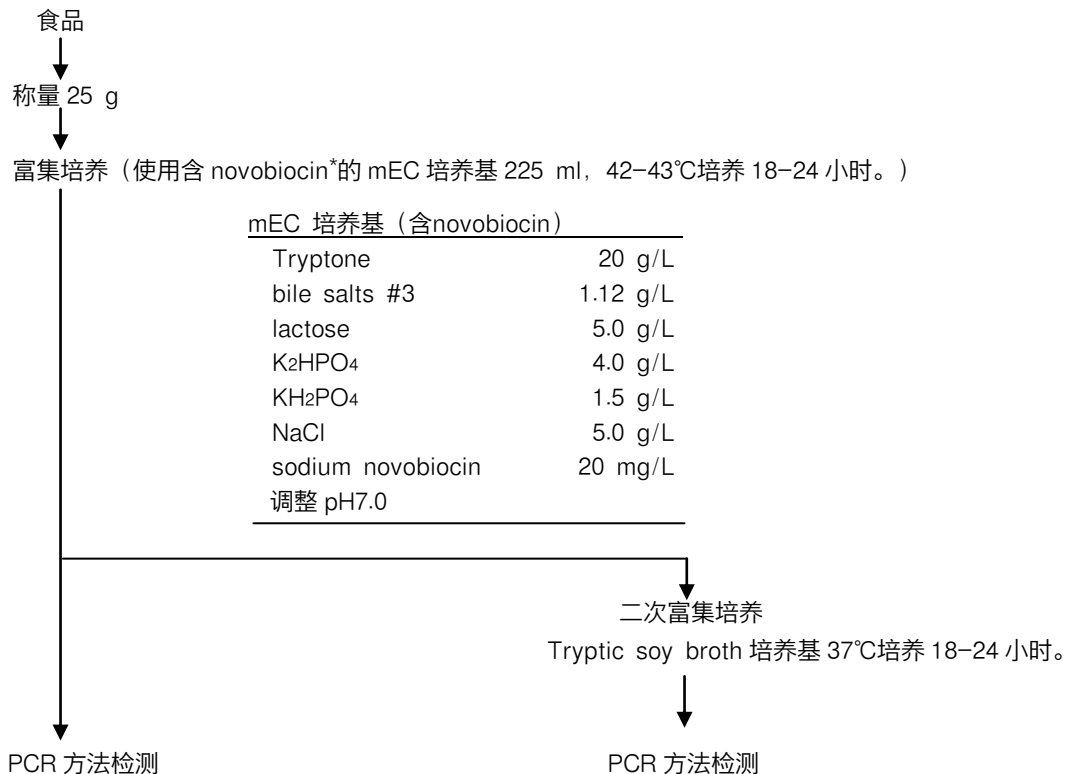
区域 2: 普通实验区域 进行样品处理及 DNA 制备。根据需要设置安全柜。

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。

区域 4: PCR 产物处理区域 在 PCR 反应后对扩增产物进行电泳检测, 与区域 1、2、3 在不同的房间。

● 以食品样品为例进行 PCR 检测的实验例

A. 样品制备



B. PCR 扩增样品的前处理

富集培养液 4 μl 加入到 1.5 ml Tube 或 2 μl 富集培养液加入到 0.2 ml Tube 中

↓

分别加入 196 μl 的 TE Buffer [10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA (pH8.0)] 或 98 μl TE Buffer, 混匀

↓

95°C 5 min 热处理

↓

离心 (12000 rpm, 4°C, 10 min), 回收上清

↓

取 25 μl 上清进行 One Shot PCR 反应

● 关联产品

PCR Pathogenic Bacterial Primers Set EVT-1, EVT-2 (VT1 gene of EHEC) (Code No. S006)

PCR Pathogenic Bacterial Primers Set EVS-1, EVS-2 (VT2 gene of EHEC) (Code No. S007)

PCR Pathogenic Bacterial Primers Set EVC-1, EVC-2 (VT genes of EHEC) (Code No. S008)

Positive Control Templates for PCR Pathogen Detection (Code No. S031-S046)

TaKaRa Ex Taq® (Code No. RR001A/B/C)

PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A)

Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50x Powder, pH8.3 (Code No. T9131)

TBE (Tris-borate-EDTA) powder (Code No. T905)

pHY Marker (Code No. 3404A/B)

φX174-*Hinc* II digest (Code No. 3406A/B)
100 bp DNA Ladder (Code No. 3407A/B)
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (Code No. 5760A/5761A)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Touch (Code No. TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient (Code No. TP600)
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (Code No. NJ200)
Mupid-2 plus (Code No. M-2P)
Mupid-exU (Code No. EXU-1)

● 参考文献

- 1) Takao, T., T. Tanabe, Y.-M. Hong, Y. Shimonishi, H. Kurazono, T. Yutsudo, C. Sasakawa, M. Yoshikawa and Y. Takeda (1988) *Microb. Pathog.*, **5**, 357-369.
- 2) Jackson, M.P., R.J. Neil, A.D. O'Brien, R.K. Holmes and J.W. Newland (1987) *FEMS Microbio. Lett.*, **44**, 109-114.
- 3) Ito, H., A. Terai, H. Kurokawa, Y. Takeda and M. Nishibuchi (1990) *Microb. Pathog.*, **8**, 47-60.
- 4) Weinstein, D.L., M.P. Jackson, J.E. Samuel, R.K. Holmes and A.D. O'Brien (1955) *J. Bacteriol.*, **170**, 4223-4230.

SYBR is a registered trademark of Life Technologies Corporation.

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

Thermal Cycler Dice, *Ex Taq*, PrimeGel 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>