

Code No. RR264

研究用

---

**TaKaRa**

TaKaRa qPCR *Salmonella*  
Detection Kit China Standard

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒原理	1
● 注意事项	2
● 操作方法	2
● 结果判定	7

## ● 制品说明

沙门氏菌 (*Salmonella*) 是重要的肠道致病菌, 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。本试剂盒是根据中华人民共和国出入境检验检疫行业标准《SN/T 1059.7-2010 进出口食品中沙门氏菌检测方法 实时荧光 PCR 法》开发的用于定性检测沙门氏菌的 Real Time PCR 试剂盒。试剂盒中采用一种 2X 浓度的 Premix Type 试剂, 进行实验时, PCR 反应液的配制十分方便简单。制品中的 DNA 聚合酶使用了改良后的 Hot Start 法用 DNA 聚合酶 *TaKaRa Ex Taq* HS, 与 Takara 精心研制的 Real Time PCR 用 Buffer 组合使用, 可以有效抑制非特异性的 PCR 扩增, 大大提高 PCR 的扩增效率, 能进行高灵敏度的 Real Time PCR 扩增反应。本检测无需电泳, 简单快速, 灵敏度高、特异性强。

## ● 制品内容 (25 $\mu$ l 反应 $\times$ 40 次量)

1. <i>Premix Ex Taq</i> <sup>TM</sup> (Probe qPCR) (2X Conc.) *1	500 $\mu$ l
2. ROX Reference Dye (50X Conc.) *2	20 $\mu$ l
3. ROX Reference Dye II (50X Conc.) *2	20 $\mu$ l
4. <i>Salm</i> P1 Primer (10 $\mu$ M)	20 $\mu$ l
5. <i>Salm</i> P2 Primer (10 $\mu$ M)	20 $\mu$ l
6. Probe for <i>Salm</i> (25X)	40 $\mu$ l
7. <i>Salm</i> Positive Control ( $5 \times 10^5$ copies/ $\mu$ l) *3	30 $\mu$ l
8. RNase Free dH <sub>2</sub> O	1 ml

\*1 内含 *TaKaRa Ex Taq* HS, dNTP Mixture, Mg<sup>2+</sup>, Tli RNaseH 等。

\*2 只使用在 Life Technologies 等的 Real Time PCR 扩增仪上, 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。StepOnePlus Real-Time PCR System 使用 ROX Reference Dye, 7500 Fast Real-Time PCR System 使用 ROX Reference Dye II。使用 Thermal Cycler Dice<sup>TM</sup> Real Time System // 时不必添加。

\*3 *Salm* Positive Control 仅作为反应性能监测的对照, 浓度仅供参考。实验时请使用阳性标本提取的 DNA 作为阳性对照。

### 【各种引物序列】

引物名称	引物序列
<i>Salm</i> P1 Primer	5'- CTCACCAGGAGATTACAACATGG-3'
<i>Salm</i> P2 Primer	5'- AGCTCAGACCCAAAAGTGACCATC -3'
Probe for <i>Salm</i>	5'- FAM-CACCGACGCGAGACCGACTTT-TAMRA-3'

序列参考《SN/T 1059.7-2010 进出口食品中沙门氏菌检测方法 实时荧光 PCR 法》。

## ● 保 存: -20°C

注意: *Premix Ex Taq* (Probe qPCR) 4°C 保存 (稳定性高达 6 个月)。

运输储存全程需要高度防污染。

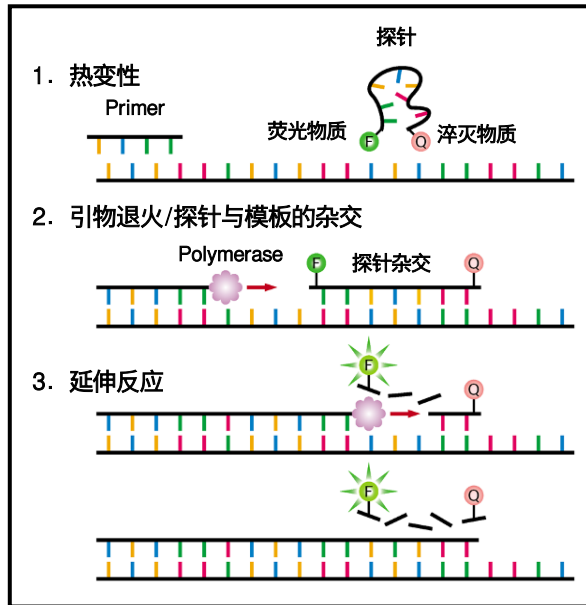
收货后 4°C 保存。使用前轻轻颠倒以确保试剂完全溶解并充分混匀。

可在 -20°C 长期保存, 一旦融解请于 4°C 保存, 并在 6 个月之内使用完。

## ● 试剂盒原理

探针法是使用 5' 端带有荧光物质 (如: FAM 等), 3' 端带有淬灭物质 (如: TAMRA 等) 的探针进行荧光检测的方法。当探针完整时, 5' 端的荧光物质受到 3' 端淬灭物质的制约, 不能发出荧光。而当探针被分解

后，5' 端的荧光物质便会游离出来，发出荧光。当 PCR 反应液中加入荧光探针后，在 PCR 反应的退火过程中，荧光探针便会和模板杂交。进一步在 PCR 反应的延伸过程中，*Taq* DNA 聚合酶的 5' → 3' Exonuclease 活性可以分解与模板杂交的荧光探针，游离荧光物质发出荧光。通过检测反应体系中的荧光强度，可以达到检测 PCR 产物扩增量的目的。具体原理见下图。



## ● 注意事项

1. Real Time PCR 扩增仪的使用请按照仪器说明书进行。
2. 判断为阳性的样品，要用微生物学方法进行再确认，参照 SN0170。
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。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。

4. 本制品是使用 Real Time PCR 扩增仪对结果进行分析、判定。当 Real Time PCR 扩增仪的 Auto 功能不适合时，将会导致结果判定错误。此时可参照 Real Time PCR 扩增仪说明书进行手动设定。
5. 使用 *Premix Ex Taq* (2X Conc.) 时，请上下颠倒轻轻混合均匀，避免起泡，经轻微离心后使用。试剂没有混匀时反应性能会有所下降，本制品不能用振荡器混匀。*Premix Ex Taq* (2X Conc.) 于 -20℃ 保存时容易形成沉淀，此时，轻轻用手握一会儿或室温放置一段时间后，颠倒混匀可以完全融解。

## ● 操作方法

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)

可采用《SN/T 1059.7-2010 进出口食品中沙门氏菌检测方法 实时荧光PCR法》中的方法。

#### 2. 反应液的配制

(1) 按下列组份配制 PCR 反应液 (在区域 1 进行)

除检测样品外, 其他各反应组份应先按检测样品数+3 的量 (含阳性对照、阴性对照) 配制 Master Mix, 取配制好的 Master Mix 23  $\mu$ l 分装到 0.2 ml Tube 管中, 盖上反应管盖。

试剂	使用量	终浓度
<i>Premix Ex Taq</i> (Probe qPCR) (2X Conc.)	12.5 $\mu$ l	1X
<i>Salm</i> P1 Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
<i>Salm</i> P2 Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
Probe for <i>Salm</i> (25X)	1 $\mu$ l	1X
ROX Reference Dye* 或 ROX Reference Dye II* 或 dH <sub>2</sub> O	0.5 $\mu$ l	1X
检测样品或阳性对照或阴性对照	2 $\mu$ l	
RNase Free dH <sub>2</sub> O	up to 25 $\mu$ l	

\*请根据实际使用的 Real Time PCR 扩增仪选择相应的 ROX Reference Dye. 使用 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) 时添加 ROX Reference Dye II, 使用 Thermal Cycler Dice™ Real Time System 时添加 dH<sub>2</sub>O。

(2) 样品 (模板) 的添加 (在区域 3 进行)

一管作为阴性对照加入灭菌水, 剩余的管里加入样品或 Positive Control, 盖紧反应管盖。

【注】因为是定量检测, 所以在盖 Tube 管盖时要戴手套, 避免污染。

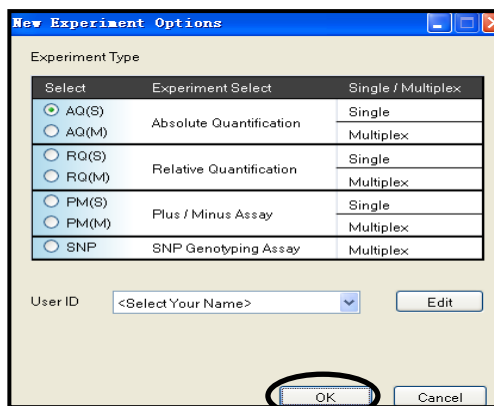
(3) 将 0.2 ml Tube 用小型离心机进行轻微离心, 放置于 Real Time PCR 仪上。

#### 3. 使用 Real Time PCR 仪进行反应 (在区域3进行)

各种 Real Time PCR 仪的操作方法参见仪器的操作说明书。以下介绍使用 Thermal Cycler Dice™ Real Time System // (Code No. TP900) 及 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) 时的操作方法。

【使用 Thermal Cycler Dice™ Real Time System // (Code No. TP900)】

(1) 创建一个新的运行文件, 选择 File 下拉菜单中的 New。选择 “AQ (S)”。



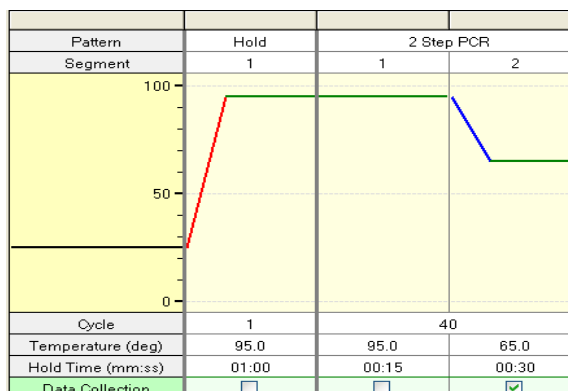
- (2) 在 Thermal Profile Setup 界面下、Collect Data 栏中选择“FAM”，按以下 PCR 条件进行设定。  
建议采用以下条件进行反应。

预变性 (Hold)

Cycle: 1  
95°C 1 min.

2 Step PCR

Cycle: 40  
95°C 15 sec.  
65°C 30 sec. (检出)



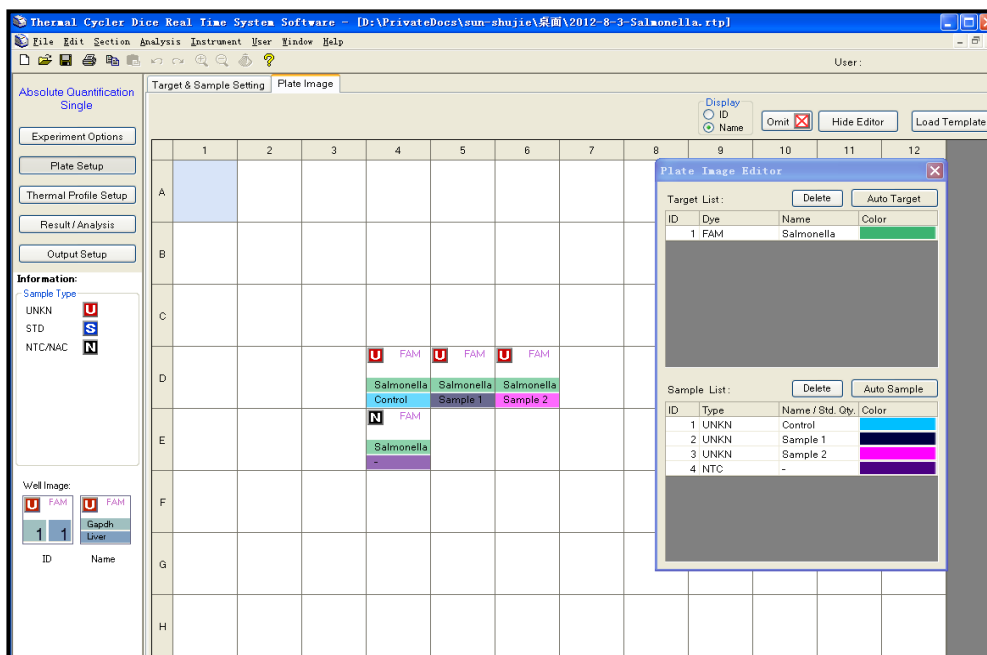
◆ 特别提示:

本制品中使用的 *TaKaRa Ex Taq* HS 是利用抗 *Taq* 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶，与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比，不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。

- (3) 将反应管放入仪器，点击画面右下方的“Start Run”键，开始反应。

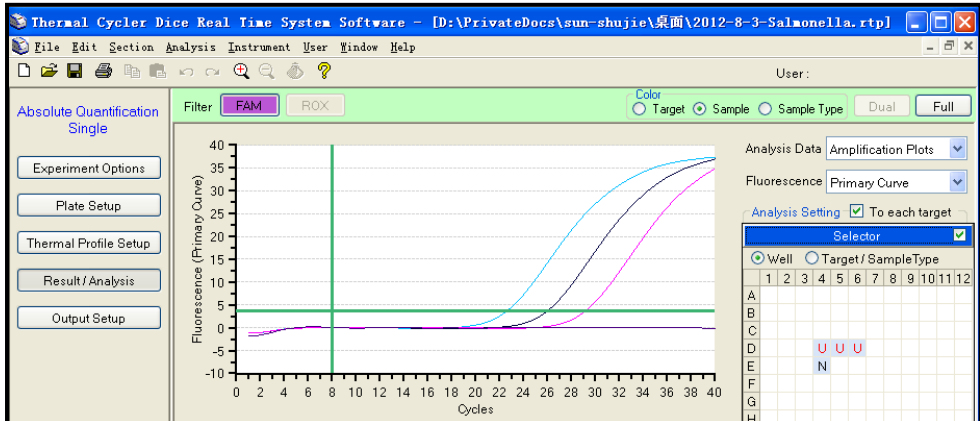


- (4) 在 Plate Setup 界面下设定样品信息：在 Target & Sample Setting 界面，Target List→Dye 选择 FAM，Name 处标记所检测的基因名称；Sample List→Type：样品和阳性对照选择 UNKN，阴性样品选择 NTC，在 Name/Std.Qty.处标记相应的样品名称。在 Plate Image 界面选择相应的反应孔。以 2 个检测样品、1 个阴性对照和 1 个阳性对照为例设置如下图：



## (5) 结果分析

① 反应结束后，在 Result/Analysis 界面下确认结果。



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。

阳性对照在FAM通道得到一条超过阈值的扩增曲线。

## 【使用 ABI 7500 Fast Real Time PCR System】

(1) 创建一个新的运行文件，直接点击New Experiment, 设置Experiment Properties。选择TaqMan Reagents。

(2) 在 Plate Setup 界面下设定样品信息：在 Define Targets and Sample→Define Targets→Target Name 处标记检测的基因名称，Reporter 选择 FAM, Quencher 选择 TAMRA; Define Samples → Sample Name 处标记检测的样品名称。在 Assign Targets and Samples 界面设置反应孔信息，选择反应孔，点击相应的 target 和 Sample，并标记相应的 Task，阳性对照和样品选择 U (unknown)，阴性对照选择 N (Negative)；如果使用 ROX Reference Dye II 做校正，在 Select the dye to use as the passive reference 处选择 ROX。

以 2 个检测样品、1 个阴性对照和 1 个阳性对照为例设置如下图：

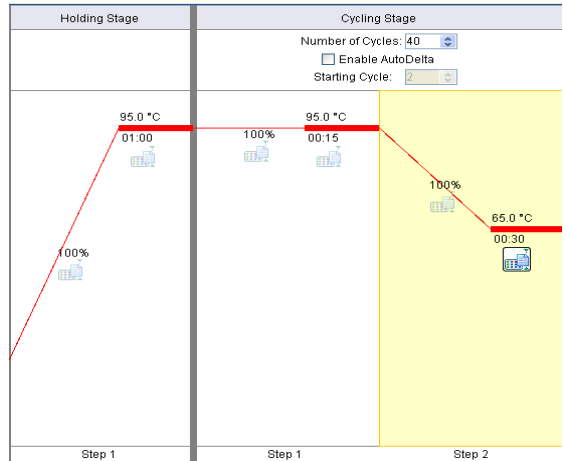
(3) 在 Run Method 界面设定反应条件。

预变性 (Hold)

Cycle: 1  
95°C 1 min.

2 Step PCR

Cycle: 40  
95°C 15 sec.  
65°C 30 sec. (检出)

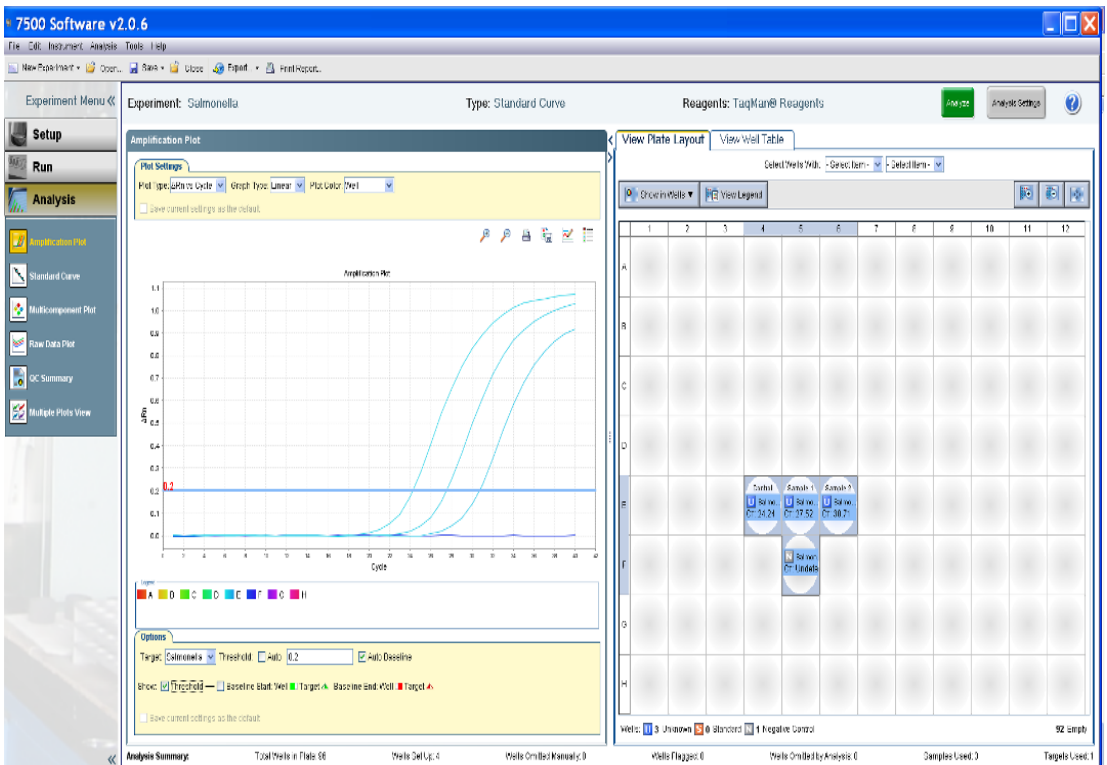


(4) 将反应管放入仪器点击右上角的 START RUN 开始进行反应。



(5) 结果分析

① 反应结束后，在 Analysis 界面下确认结果。





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。

阳性对照在FAM通道得到一条超过阈值的扩增曲线。

● 结果判定

Real Time PCR 结果	结果判断
检测样品有扩增，且 Ct 值 ≤35。	阳性
检测样品有扩增，35 < Ct 值 < 40，重复一次，Ct 值仍小于 40，并且曲线有明显的对数增长期。	阳性
样品无 Ct 值，扩增曲线为一条直线。	阴性
Positive Control 及检测样本均无荧光信号值	反应失败
Negative Control 实验中有荧光信号值	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 Real Time PCR 反应。

判定标准参照行业标准《SN/T 1059.7-2010 进出口食品中沙门氏菌检测方法实时荧光 PCR 法》。

Premix Ex Taq 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。

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686  
4006518761, 4006518769

**TAKARA BIO INC.**

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