

TaKaRa Code: DCY209

**CycleavePCR[®] *Legionella*
Detection Kit
(25 μ l 反应 \times 50 次量)**

说明书

TaKaRa

宝生物工程(大连)有限公司

目 录

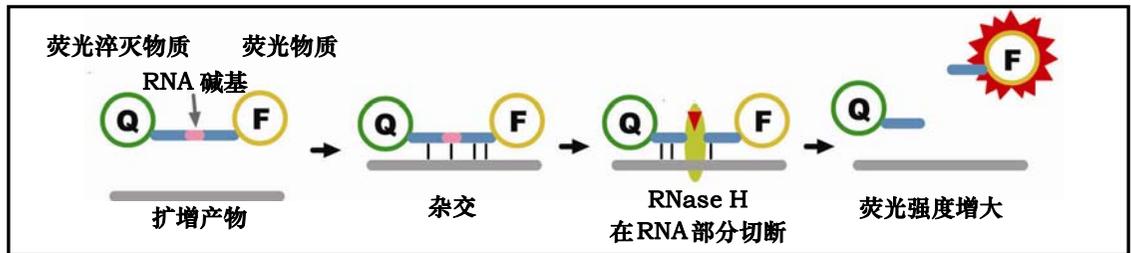
内 容	页 码
●制品说明	1
●制品内容	1
●保 存	1
●操作注意事项	2
●可能检出的菌种	2
●操作方法	4
●结果分析	5

● 制品说明

Legionella pneumophila 为代表的军团菌属细菌是需氧型革兰氏阴性杆菌。广泛分布于土壤和淡水中，污染冷却水塔、循环式水浴槽、温泉等环境水中也存在。通过空气传播，经呼吸道吸入人体引起军团菌症。目前，被发现的军团菌有 70 种以上，这些种类军团菌都有可能引起军团菌症。但从军团菌症患者和环境水检出的结果看，*Legionella pneumophila* 检出率最高。传统的军团菌检出主要手段是通过培养方法来判断，此方法费时，操作麻烦。

本制品是通过 Cycling Probe 法可以迅速、特异性检出 *L.pneumophila* 的 mip (macrophage infectivity potentiator protein) 基因和军团菌属菌共有的 5S rRNA 基因。制品中 mip 基因用 FAM 标记，5S 基因用 ROX 标记，内参照用 HEX 标记，在同一反应管内对 mip 基因、5S rRNA 及内参照 (Internal Control) 同时进行扩增，通过三种不同荧光标记的探针可以对 mip 基因、5S rRNA 基因及内参照同时检出，实现多通道同步检测。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。制品中 DNA 聚合酶使用了改良后的 Hot Start 法用 DNA 聚合酶 *TaKaRa Ex Taq HS*，可以有效抑制非特异性的 PCR 扩增，大大提高 PCR 的检测灵敏度。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。本技术由 ID Biomedical 公司授权。



● 制品内容 (25 μ l \times 50 次量)

1. <i>TaKaRa Ex Taq HS</i> (5 U/ μ l)	12.5 μ l (50 次)
2. Tli RNase H II (200 U/ μ l) *1	25 μ l (50 次)
3. 5 \times Reaction Mixture*2	250 μ l (50 次)
4. Primer Mixture	150 μ l (50 次)
5. Probe Mixture *3 (FAM, HEX, ROX标记)	150 μ l (50 次)
6. Mip Positive Control	10 μ l (10 次)
7. 5S Positive Control	10 μ l (10 次)
8. dH ₂ O	1.0 ml

*1: Tli RNase H II是 *Thermococcus litoralis*来源的耐热性RNase H。

*2: 含有dNTP和Internal Control。

*3: 荧光标记探针要注意避光。

【探针标记】

Target	Reporter	Quencher
mip	FAM	Eclipse
5S rRNA	ROX	Eclipse
Internal Control	HEX	Eclipse

● 保 存: -20 $^{\circ}$ C。

●操作注意事项

1. Real Time PCR仪的使用请参照仪器说明书进行。
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. 本 Kit 是对基因进行检测的试剂盒，因此死菌也能被检测出来，当判断样品为阳性时，要用微生物学方法进行再确认。
4. 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。

由于本制品是使用 Real Time PCR 的方法，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。

●可能检出的菌种

1. 以下军团菌属使用本制品进行 5S rRNA 基因的检出确认。

	ID-No	Species	Serogroup	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	检出
1	NIIB0145	<i>L. adelaidensis</i>		E	1762-AUS-E	49625	-
2	NIIB0040	<i>L. anisa</i>		E	WA-316-C3	35292	+
3	NIIB0405	<i>L. beliardensis</i>		E	Montbe'liard 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	MDA2706	BAA-693	+
12	NIIB0406	<i>L. drozanskii</i>		E	LLAP-1	700990	-
13	NIIB0078	<i>L. dumoffii</i>		E	NY23	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	Lyon8420412	49413	+
22	NIIB0404	<i>L. gresilensis</i>		E	Gre'oux11D13	700509	-
23	NIIB0690	<i>L. hackeliae</i>	1	C	Lansing2	35250	+
24	NIIB0691	<i>L. hackeliae</i>	2	C	798-PA-H	35999	+

	ID-No	Species	Serogroup	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	檢出
25	NIIB0053	<i>L. israelensis</i>		E	Bercovier4	43119	—
26	NIIB0046	<i>L. jamestowniensis</i>		E	JA-26-G1-E2	35298	+
27	NIIB0014	<i>L. jordani</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	—
30	NIIB1255	<i>L. londiniensis</i>	2	E	Mulhouse B26	BAA518	—
31	NIIB0692	<i>L. longbeachae</i>	1	C	Long Beach4	33462	+
32	NIIB0693	<i>L. longbeachae</i>	2	C	Tucker1	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	NIIB0001	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	1	C	Philadelphia 1	33152	+
40	NIIB0002	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	2	C	Togus-1	33154	+
41	NIIB0003	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	3	E	Bloomington-2	33155	+
42	NIIB0004	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	4	C	Los Angeles1	33156	+
43	NIIB0005	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	5	E	Dallas1E	33216	+
44	NIIB0150	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i>	5	E	U8W	33737	+
45	NIIB0006	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	6	C	Chicago2	33215	+
46	NIIB0033	<i>L. pneumophila</i>	7	E	Chicago8	33823	+
47	NIIB0034	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	8	C	Concord3	35096	+
48	NIIB0304	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	9	E	IN-23-G1-C2	35289	+
49	NIIB0050	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	10	C	Leiden1	43283	+
50	NIIB0051	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	11	C	797-PA-H	43130	+
51	NIIB0060	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	12	C	570-CO-H	43290	+
52	NIIB0061	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	13	C	82A3105	43736	+
53	NIIB0062	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	14	C	1169-MN-H	43703	+
54	NIIB0063	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	15	C	Lansing3	35251	+

	ID-No	Species	Serogroup	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	检出
55	NIIB0451	<i>L. pneumophila</i>	untypable	E	H13-192		+
56	NIIB0453	<i>L. pneumophila</i>	untypable	E	H13-206		+
57	NIIB0462	<i>L. pneumophila</i>	untypable	E	H13-239		+
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	+
73	NIIB0197	<i>L. worsleiensis</i>		E	1347	49508	+
74	NIIB0305	<i>Legionella</i> genomospecies 1		E	2055-AUS-E	51913	+
75	NIIB0306	<i>Legionella</i> sp.		E	LLAP-14	700313	-

检出+: 使用 10 cfu/tube 相当量的 DNA 时, 能得到阳性结果。

检出 (+): 使用 10 cfu/tube 相当量的 DNA 时, 不能检出, 使用 100 cfu/tube 相当量的 DNA 时, 能得到阳性结果。

检出 -: 使用 10 cfu/tube 相当量的 DNA 时, 不能检出。

2. 使用本制品可以检测以下菌种的 mip 基因。

L. pneumophila sero group 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10

3. 使用 mip 基因的检出体系, 样品中如果有 *L. pneumophila* 存在, 即可判定为阳性。另外, 如果根据基因信息推测有 *L. worsleiensis* 和 *L. fairfieldensis* 存在, 也可能判定为阳性。

●操作方法

以下是使用 ABI PRISM 7300 Real-Time PCR System 进行 mip 基因和 5S rRNA 基因的 Positive Control 反应例。

为得到正确的检测结果, 每种目的基因检测的同时都需进行各自的阳性对照和阴性对照实验。

1. 反应液配制。

1) 在冰上配制以下反应液 (在区域 1 进行)。

试剂	使用量
5×Reaction Mixture	5 μl
Primer Mixture	3 μl
Probe Mixture	3 μl
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/μl)	0.25 μl
Tli RNase H II	0.5 μl
dH ₂ O	Up to 25 μl

2) 样品 (模板) 的添加 (在区域 3 进行)。

一管作为阴性对照加灭菌蒸馏水, 剩余的 Tube 里添加样品或阳性对照 (2 μ l Positive Control+3 μ l 灭菌蒸馏水), 盖紧盖。

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 Tube 管用小型离心机进行轻微离心, 放置于 Real Time PCR 仪上进行反应。

4) 反应条件设定

Stage 1: 初期变性

Hold

95 $^{\circ}$ C 10 秒

* 使用仪器不同, 设定时间不同。

Stage 2: PCR 反应

Repeat 40 times

95 $^{\circ}$ C 5 秒

55 $^{\circ}$ C 10 秒

72 $^{\circ}$ C 31 秒*

使用 Applied Biosystems 公司 Real Time PCR 扩增仪时必须根据仪器型号设定不同时间。7700/7900HT 设定为 30 秒, 7000/7300 设定为 31 秒, 7500 设定为 34 秒, 7500 Fast 设定为 25 秒。

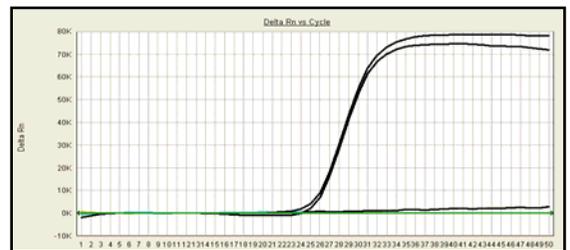
其它仪器设定时间根据仪器使用说明在一定范围内进行调整。

2. 使用 Real Time PCR 仪进行反应和结果判定 (在区域 3 进行)。

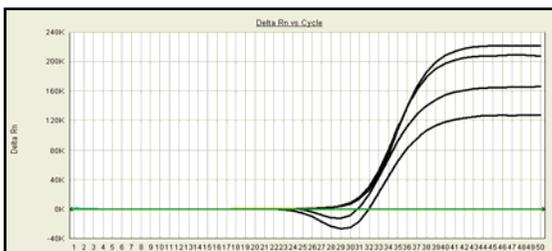
反应后仪器描绘如下扩增曲线。



mip 基因扩增曲线图 (FAM 标记)



5S 基因扩增曲线图 (ROX 标记)



内参照基因扩增曲线图 (HEX 标记)

● 结果分析

为确保检测结果的准确性, 在进行实际样品检测时, 请务必进行 Negative Control 实验和 Positive Control 实验。

① Negative Control 实验

在配制 Real Time PCR 反应液时, 用 dH₂O 替代检测样品。对各种实验结果的判定情况说明见下表。

FAM 荧光	ROX 荧光	HEX 荧光	结果判定
-	-	+	结果正常
-*2	-*2	-*2	可能是操作失败或试剂失活
+	+	+	PCR 反应体系污染。在确保反应体系不被污染的情况下再次进行反应。
+	-	+	
-	+	+	

② Positive Control 实验

在配制 Real Time PCR 反应液时，用 mip 和 5S rRNA 的 Positive Control 替代检测样品。对各种实验结果的判定情况说明见下表。

FAM 荧光	ROX 荧光	HEX 荧光	结果判定
+	+	+	结果正常
-	-	+	PCR 反应失败。可能是未添加 mip 和 5S rRNA Positive Control 或 mip 和 5S rRNA Positive Control 分解。
-	-	-	PCR 反应失败。可能是实验操作失败或试剂失活。

③ 实际样品的检测

对各种实验结果的判定情况说明见下表。

FAM 荧光	ROX 荧光	HEX 荧光	结果判定
-	+	-*1 (+)	如果同时进行的 Negative Control 实验结果正常，检测实际样品时，不管 HEX 荧光信号是否被检出（如果检测样品浓度高会抑制 Internal Control DNA 的扩增），如果有 ROX 荧光检出，可以判定 5S 基因阳性。
+	+		如果同时进行的 Negative Control 实验结果正常，检测实际样品时，不管 HEX 荧光信号是否被检出（如果检测样品浓度高会抑制 Internal Control DNA 的扩增），如果有 FAM 和 ROX 荧光同时检出，可以判定 mip 基因和 5S 基因阳性。
-*3	-*3	+	如果同时进行的 Positive Control 实验结果正常，检测实际样品时有 HEX 荧光检出，无 FAM 和 ROX 荧光检出，可以判定 mip 基因和 5S 基因阴性或在检出界线以下。
-*2	-*2	-	PCR 反应失败。注意以下几方面后再次进行反应。 ① 如果同时进行的 Positive Control 实验结果正常，则可能是样品 DNA 制备有问题，如样品中可能存在 PCR 反应的抑制物等。 ② 如果同时进行的 Positive Control 实验结果不正常，则可能是实验操作失败或试剂失活。

- *1: 各反应管中 FAM 通道或 ROX 通道检出结果为阳性，HEX 通道无荧光信号检出时，判定样品为阳性。（如果检测样品浓度高，会抑制 Internal Control DNA 的扩增，同时有些型号机器 FAM 通道的荧光信号对 HEX 通道的荧光信号会有干扰，属正常现象，不会影响正常结果判断）。
- *2: 如果所有通道都无荧光信号值，可能是 PCR 反应受到阻害。
- *3: 如果同时进行的 Positive Control 实验结果正常，检测实际样品时有 HEX 荧光检出，无 FAM 或 ROX 荧光检出，可能是样品中 DNA 含量在检出界限以下。

MEMO

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
8008909508, 4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话： 0411-87641681 87641683

传 真： 0411-87619946 87621675

E.mail: service@takara.com.cn

网 址： <http://www.takara.com.cn>

V2010.04

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂