

沙門氏桿菌之 Real-time PCR檢測

講者:袁巧璇



衛生福利部
食品藥物管理署
Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov.tw/>

課程大綱

 PCR (聚合酶鏈鎖反應)原理

 Real-time PCR(即時PCR) 原理

 沙門氏桿菌檢驗方法介紹

The Nobel Prize in Chemistry 1993



Kary B. Mullis

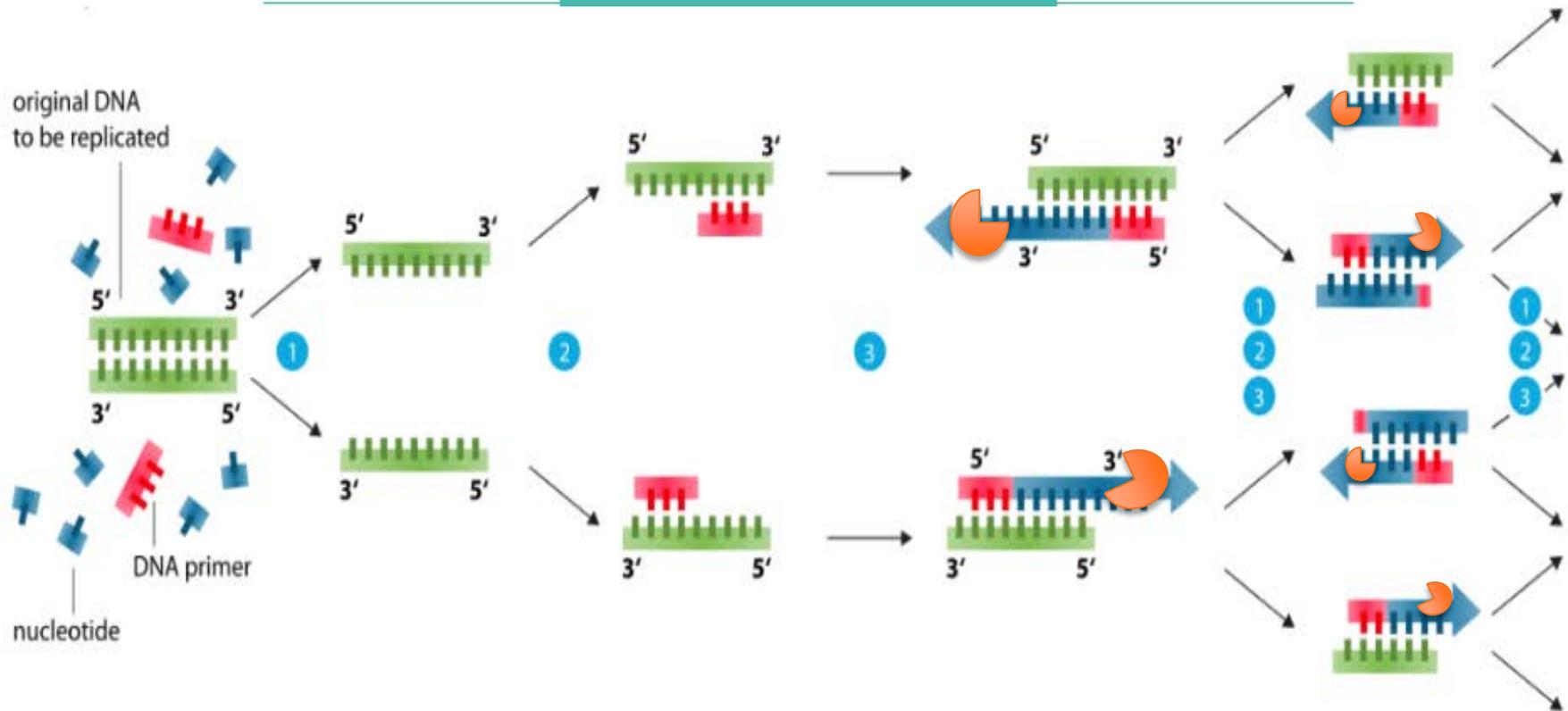
Prize share: 1/2



Michael Smith

Prize share: 1/2

PCR-Polymerase chain reaction

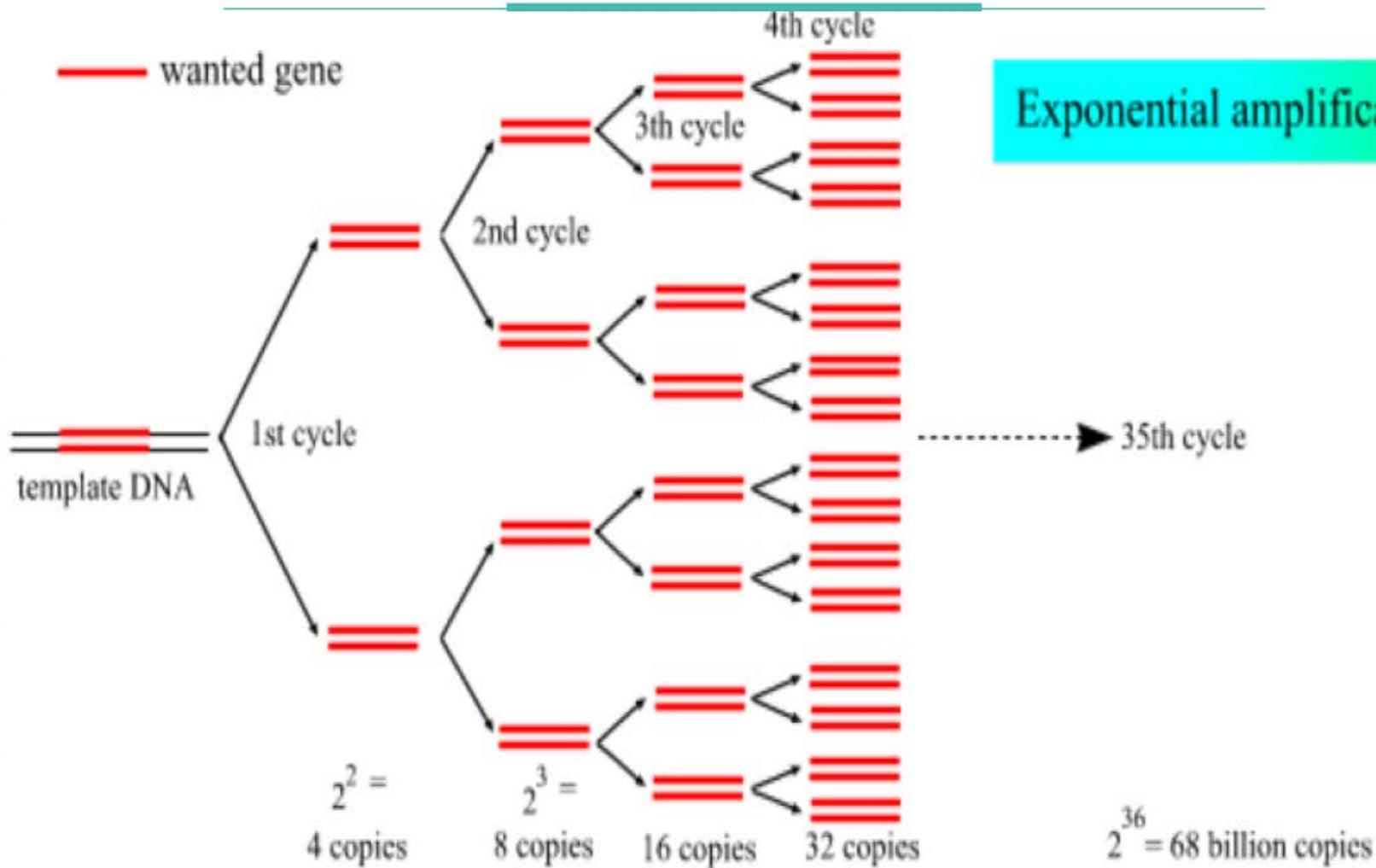


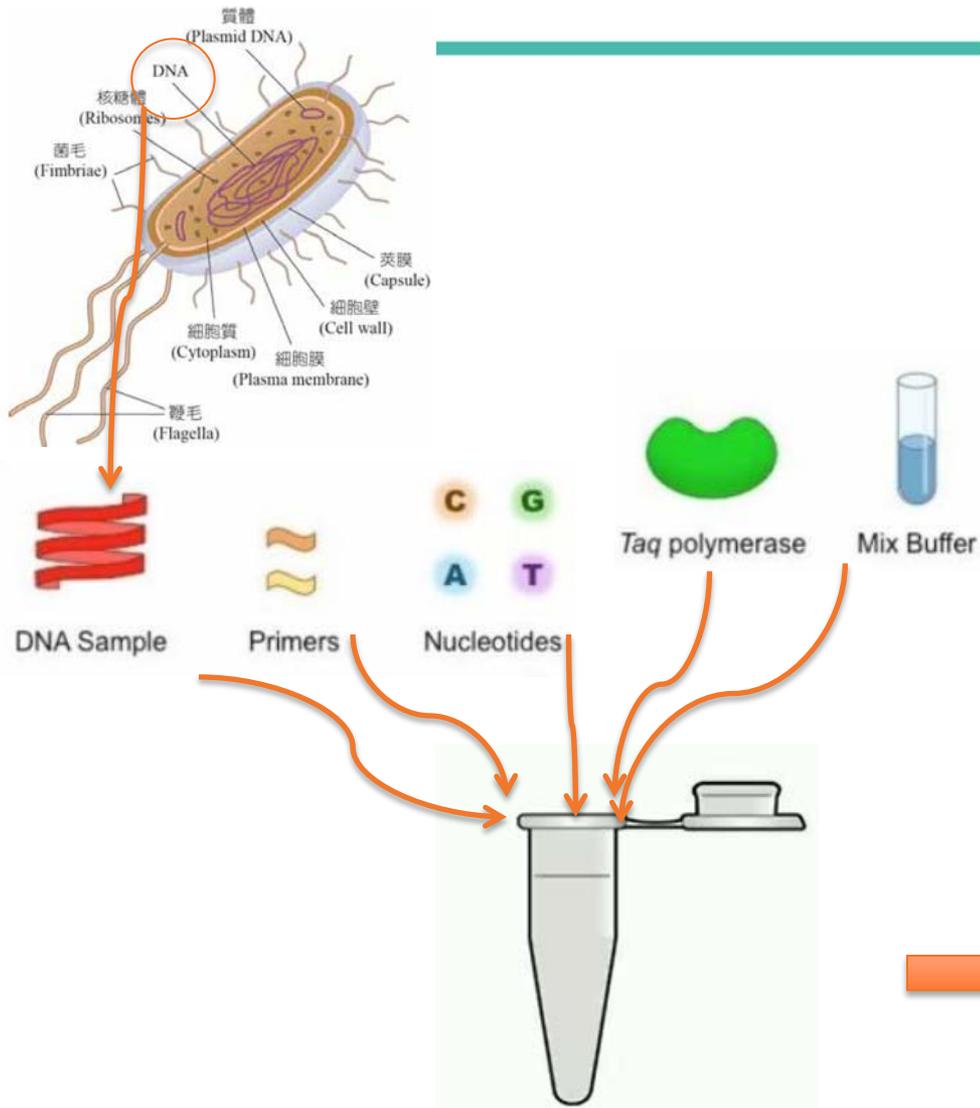
1 Denaturation at 94-96°C

2 Annealing at ~68°C

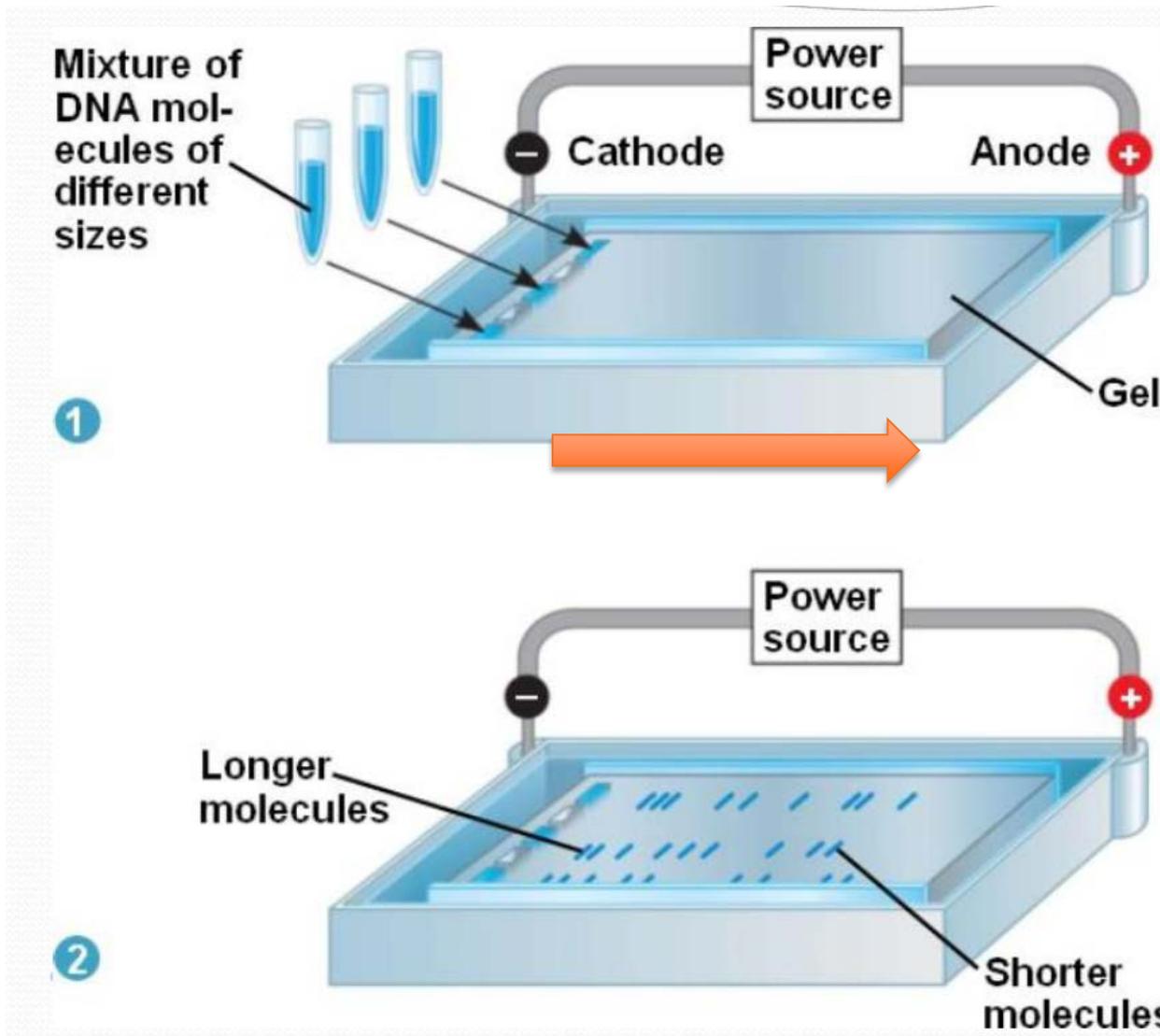
3 Elongation at ca. 72 °C

 polymerase

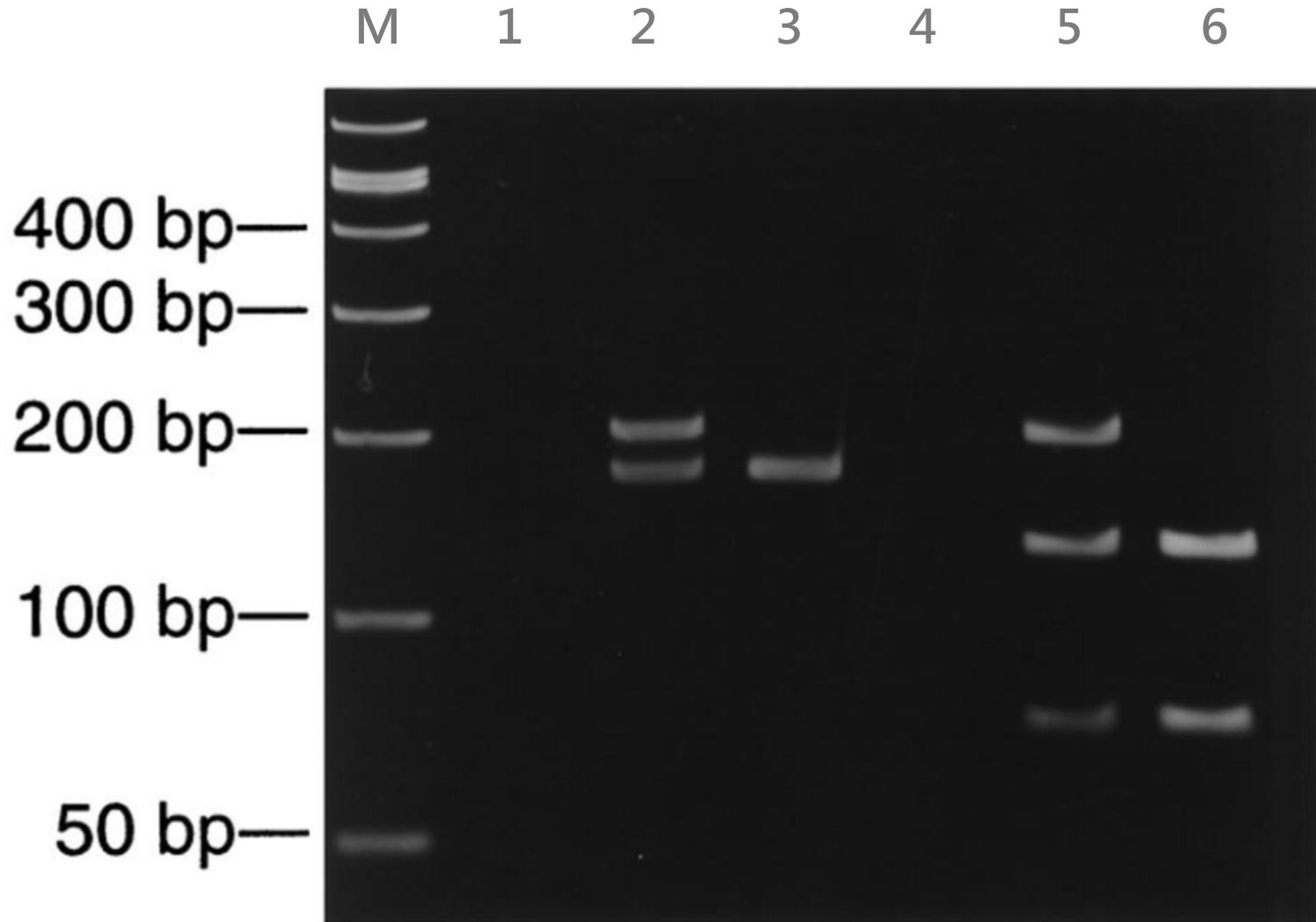




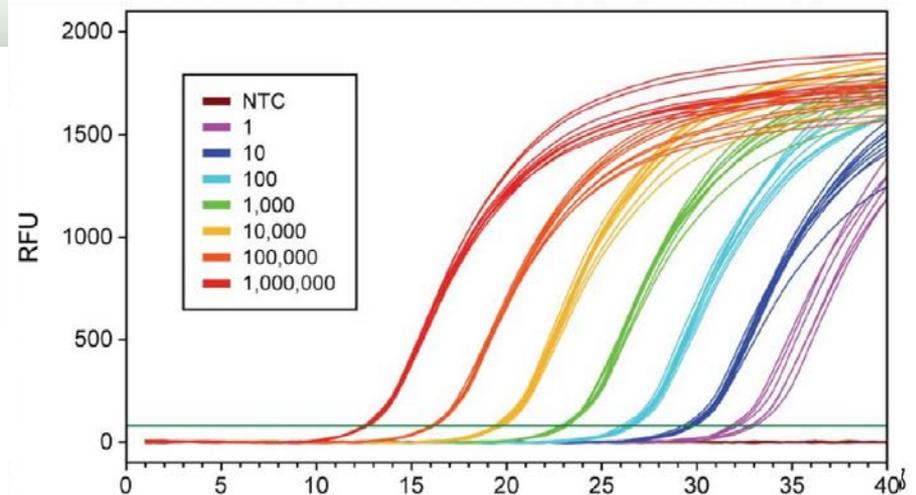
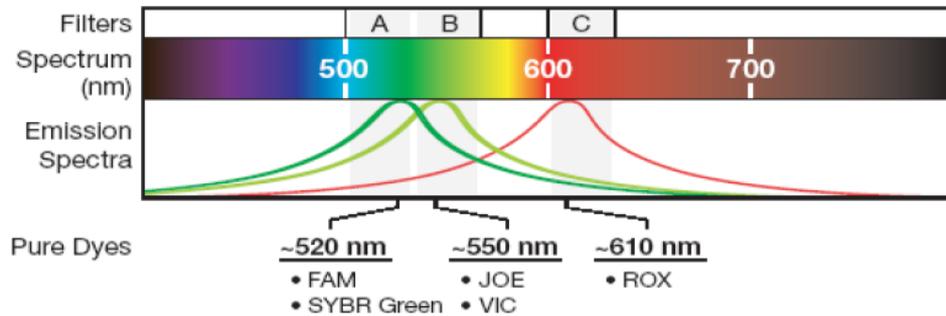
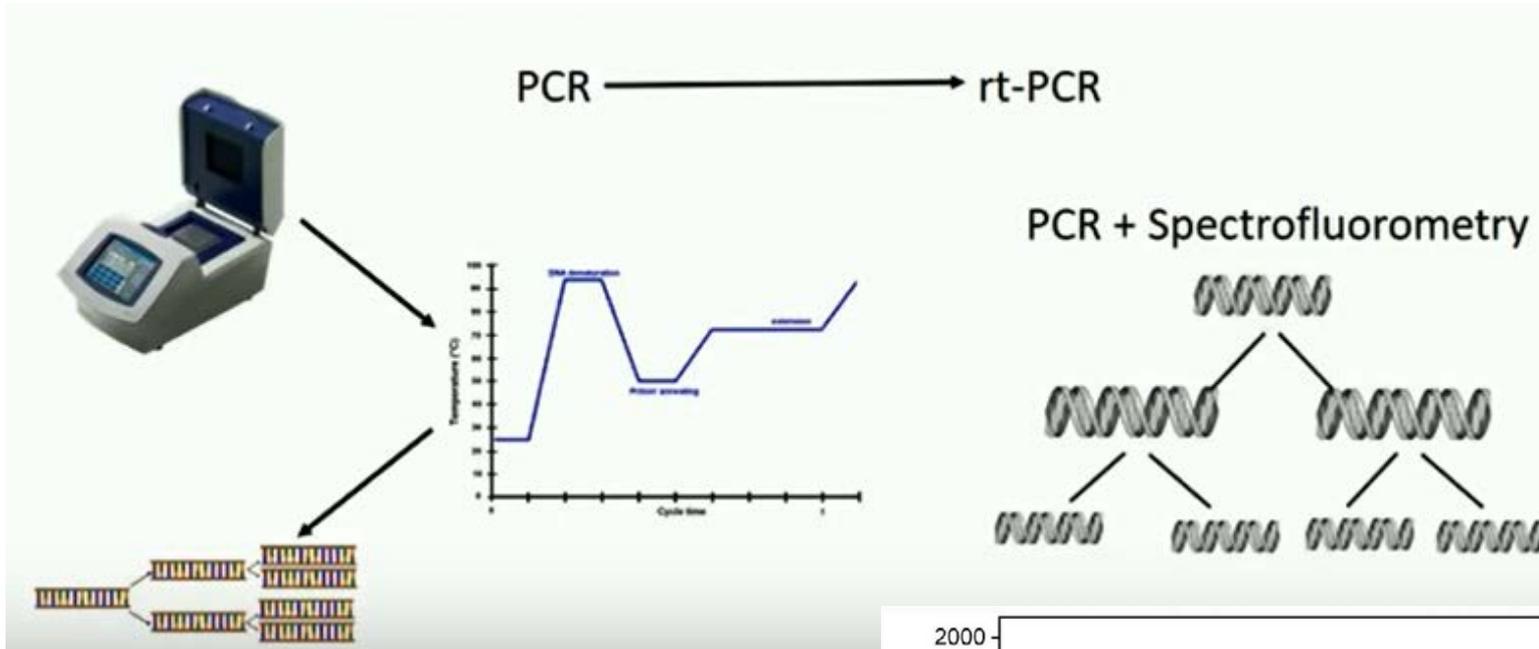
膠體電泳



電泳膠片結果



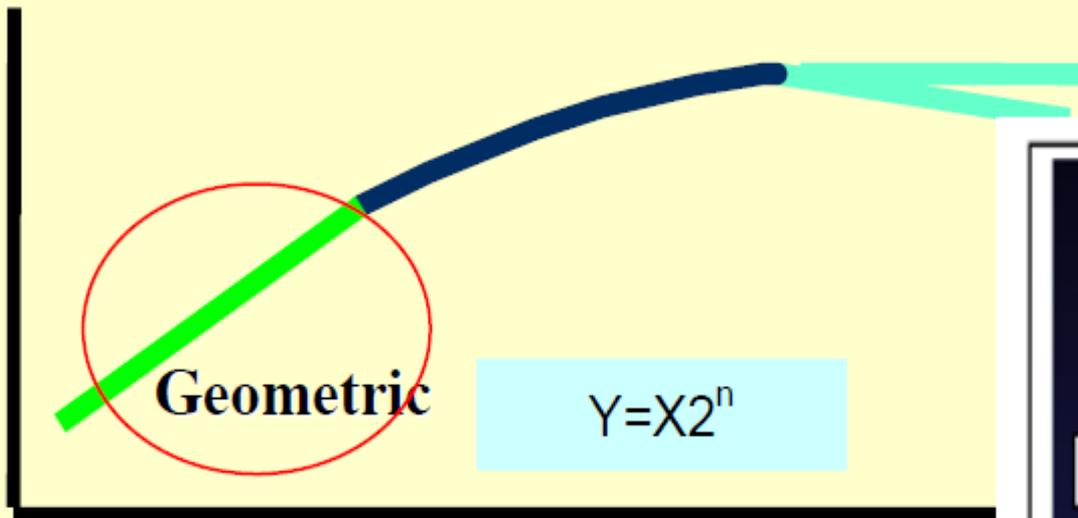
Real time PCR



檢測方式	傳統PCR	Real-time PCR
專一性	佳	優
靈敏度	普通	優
儀器成本	普通	高
檢驗成本	低	高
操作難度	普通	較繁瑣
結果判定	電泳膠片 (band)	螢光反應曲線
反應時間	較長	較短

Log [DNA]

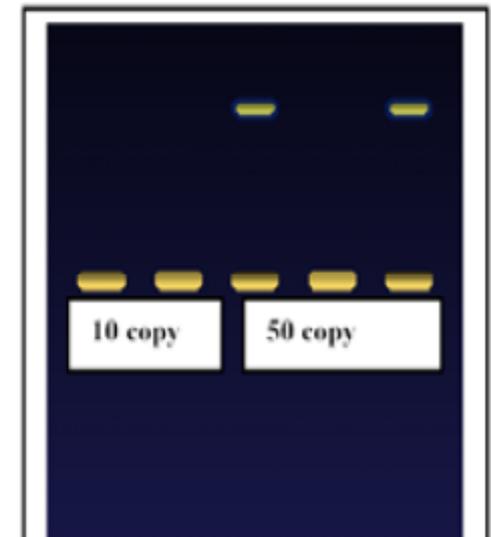
Plateau

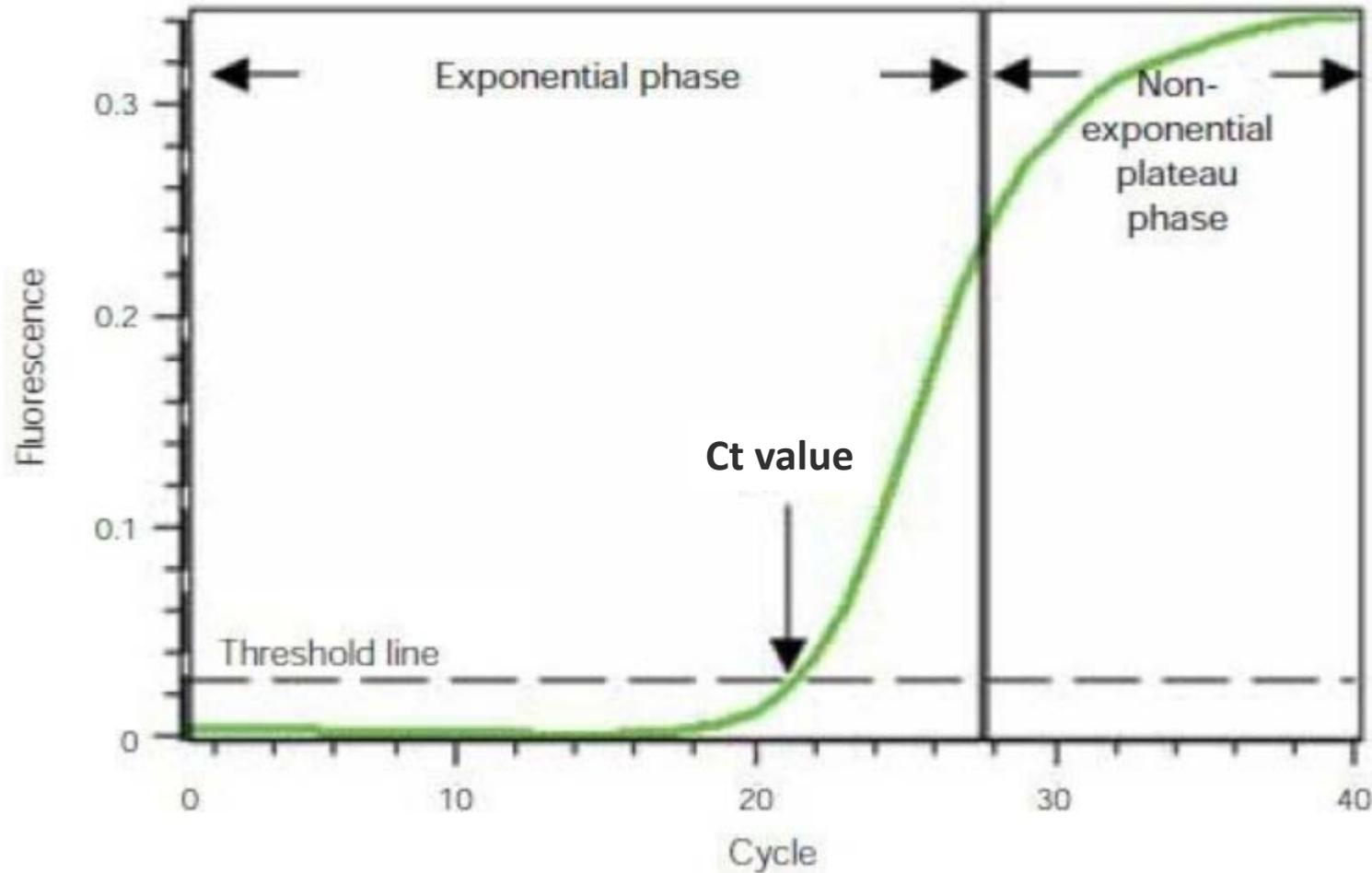


Geometric

$$Y=X2^n$$

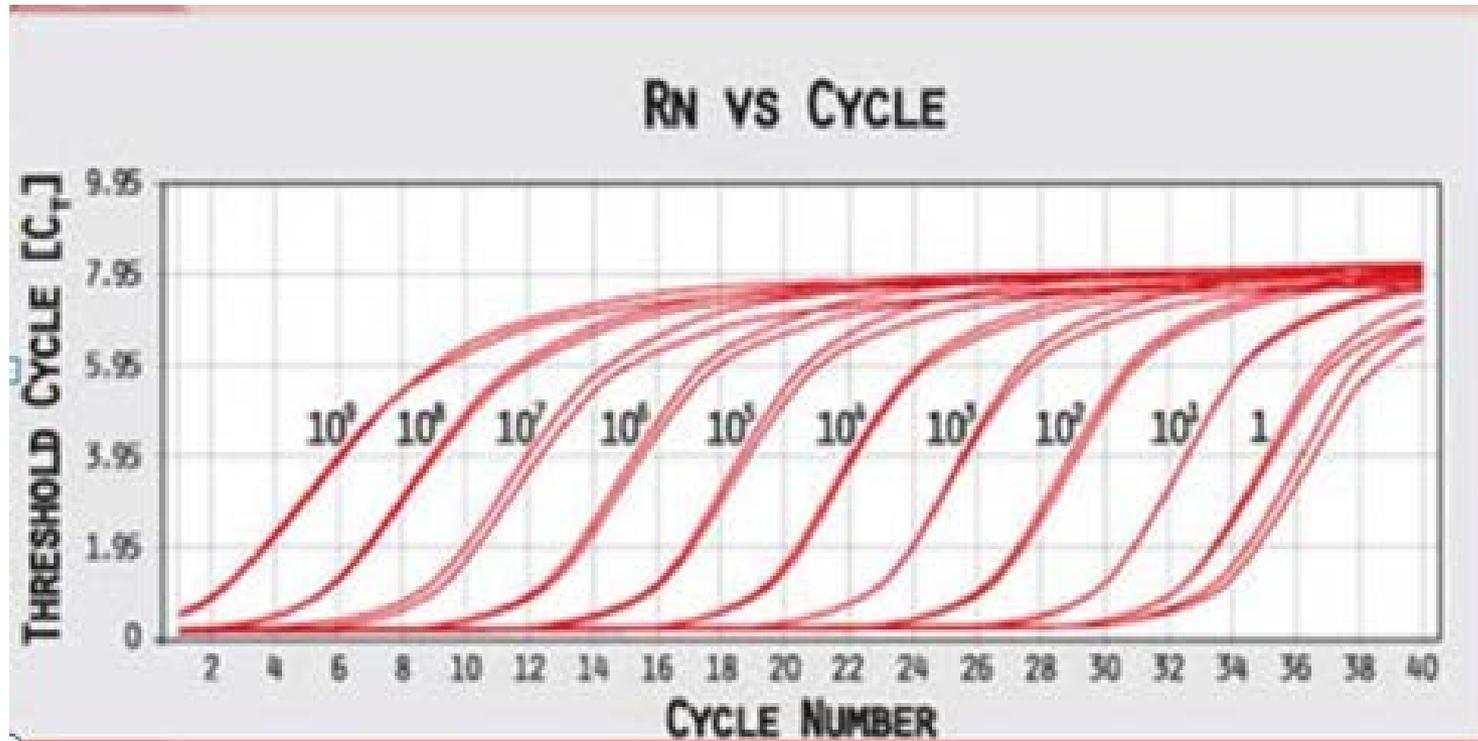
Cycle #



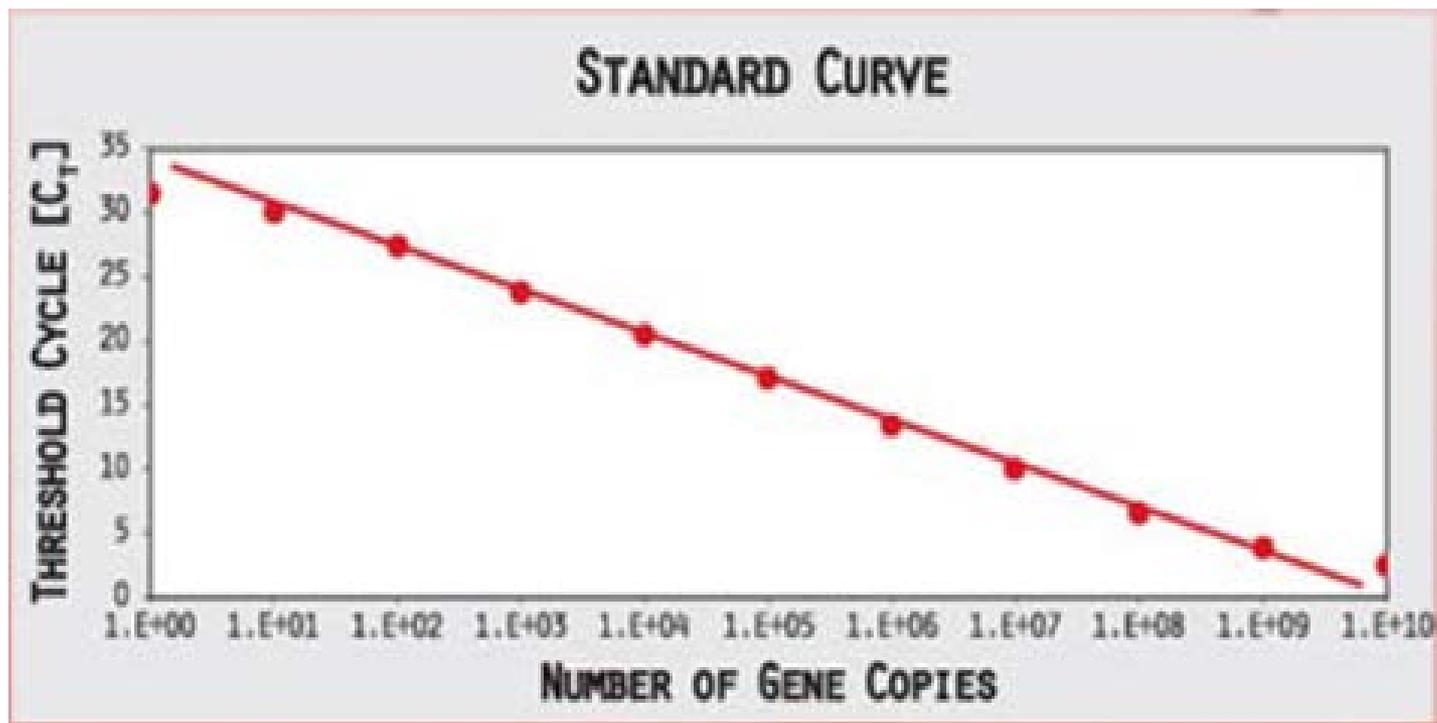


當螢光值達到偵測之閾值(Threshold)，此時所對應的循環數(cycle)稱之為Ct值。

目標DNA的濃度與Ct值成反比關係。



Quantitative PCR-qPCR



- 依據連續稀釋標準樣品的Ct值及已知濃度，可得標準曲線，根據此標準曲線可以推算樣品的起始濃度，達到定量之目的。

DNA binding dye-SYBR Green



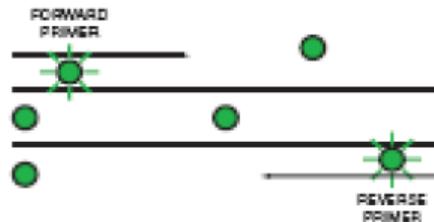
Step 1: Reaction setup

The SYBR[®] Green I dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



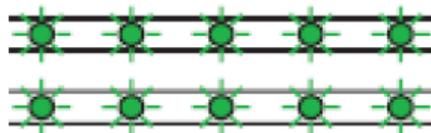
Step 2: Denaturation

When the DNA is denatured, the SYBR[®] Green I dye is released and the fluorescence is drastically reduced.



Step 3: Polymerization

During extension, primers anneal and PCR product is generated.



Step 4: Polymerization completed

SYBR[®] Green I dye binds to the double-stranded product, resulting in a net increase in fluorescence detected by the instrument.

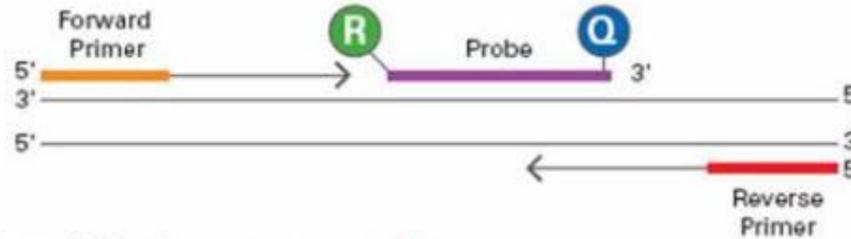
DNA binding dye-SYBR Green

- 優點: 不需額外合成probe，方法簡單，成本較低。
- 缺點: primer dimer 及非專一性PCR產物皆產訊號，無法做multiplex PCR

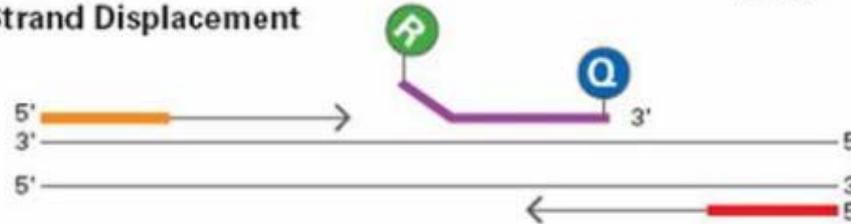
Fluorescent probe-TaqMan

Polymerization

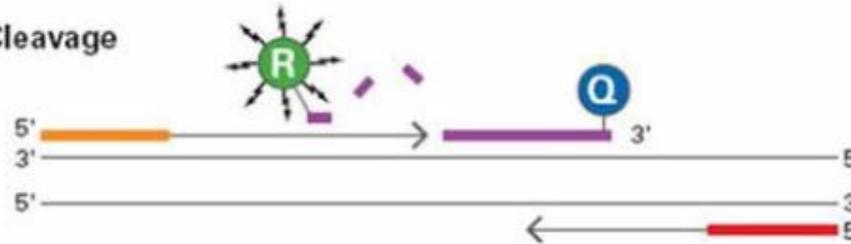
R = Reporter
Q = Quencher



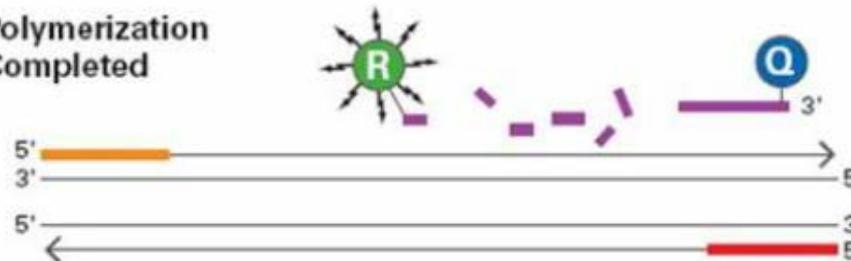
Strand Displacement



Cleavage



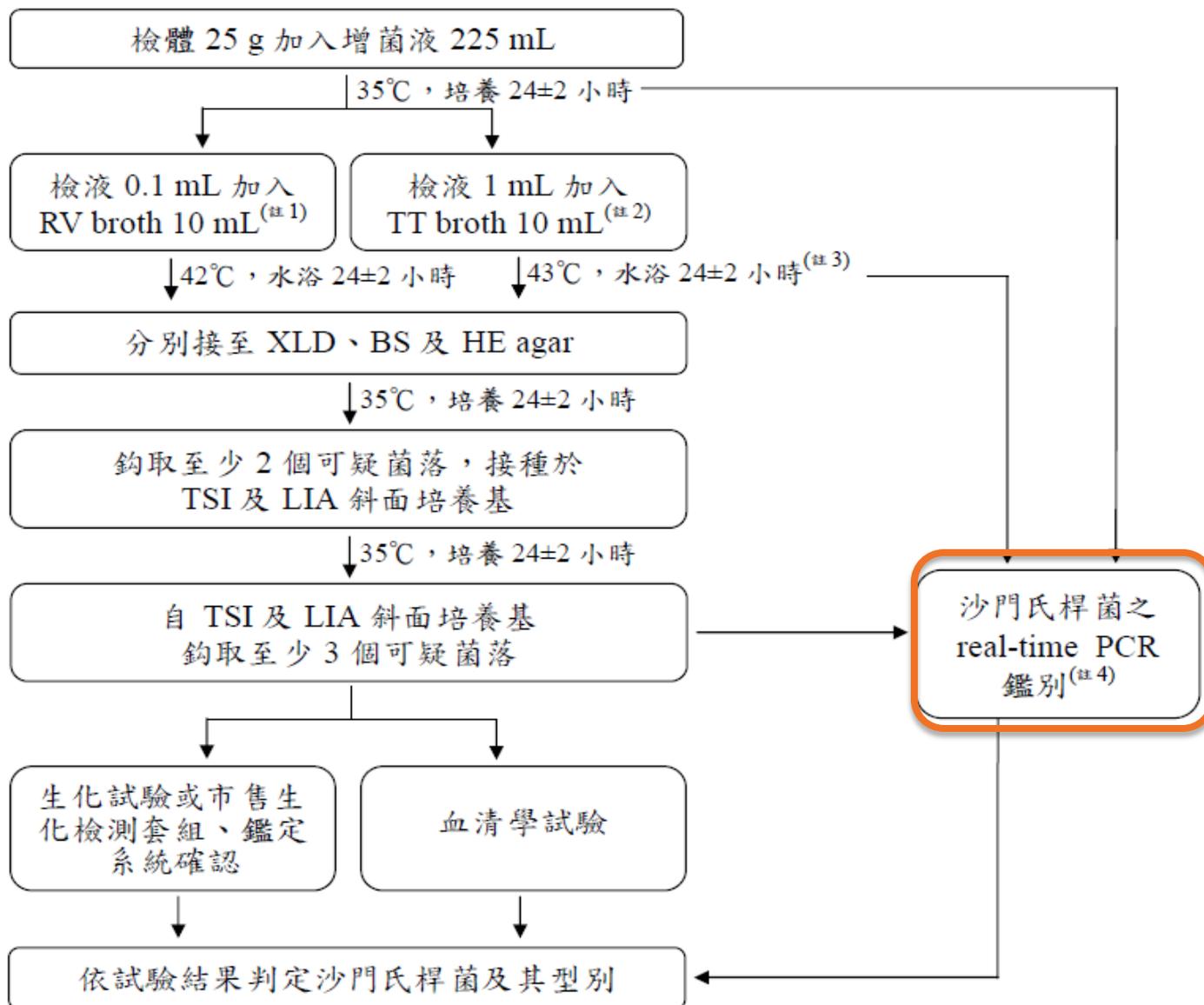
Polymerization Completed



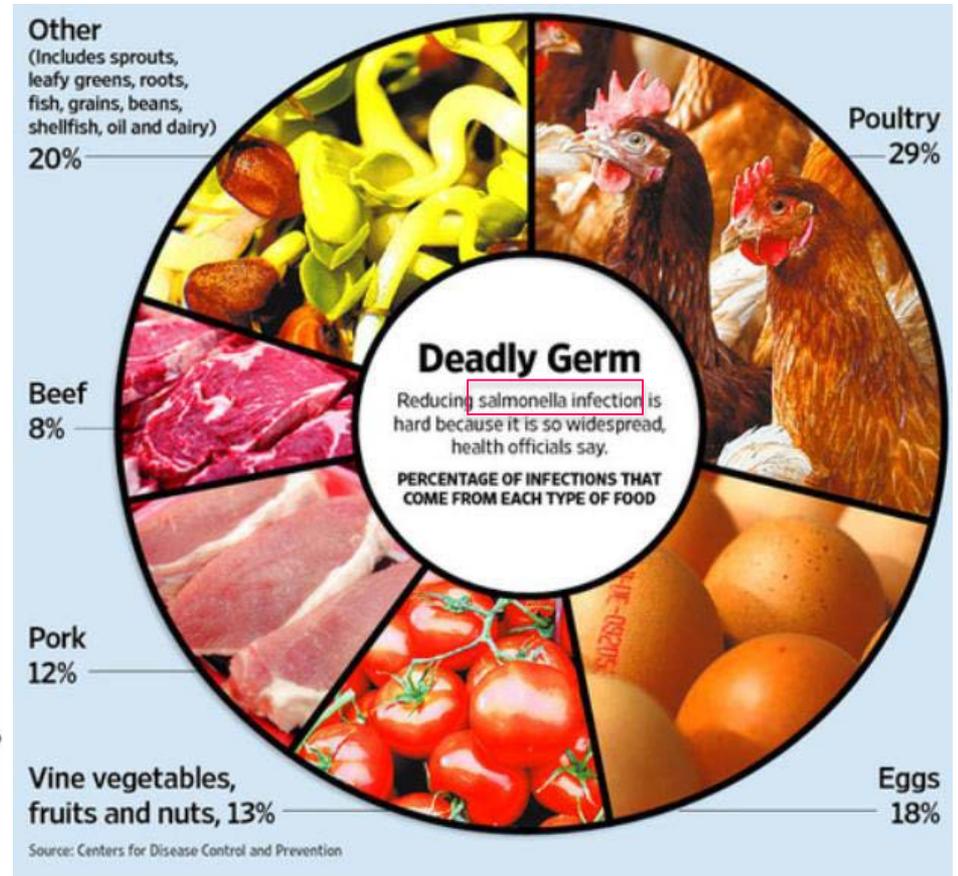
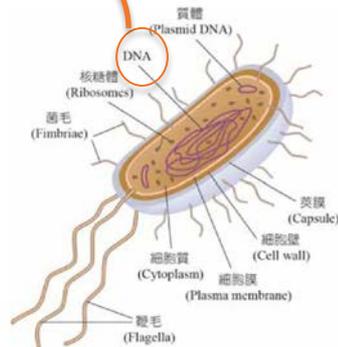
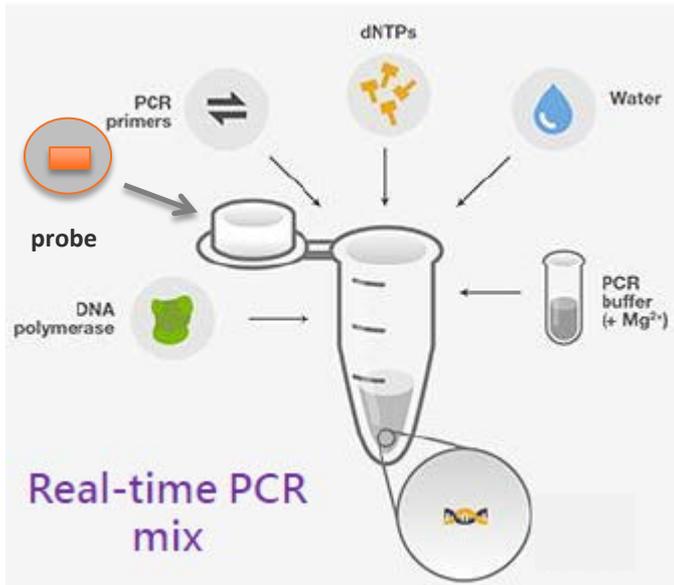
Fluorescent probe-TaqMan

- 優點：專一性佳，可做Multiplex PCR，螢光強度
- 與反應產物呈正比
- 缺點：需額外合成特殊probe，成本高，

檢驗流程圖



註4：可依檢體含菌量情況自行探討接續 real-time PCR 之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。



如何得到DNA

2.6.1.1. 直接煮沸法

將沉澱物加入無菌去離子水 1 mL，振盪混合均勻，以 $15000 \times g$ 離心 3 分鐘，去除上清液，重複操作一次。續將沉澱物加入無菌去離子水 1 mL，振盪混合均勻，置入加熱振盪器中煮沸 10 分鐘，取出離心管，作為檢體 DNA 原液，置於 -20°C 冷凍保存。

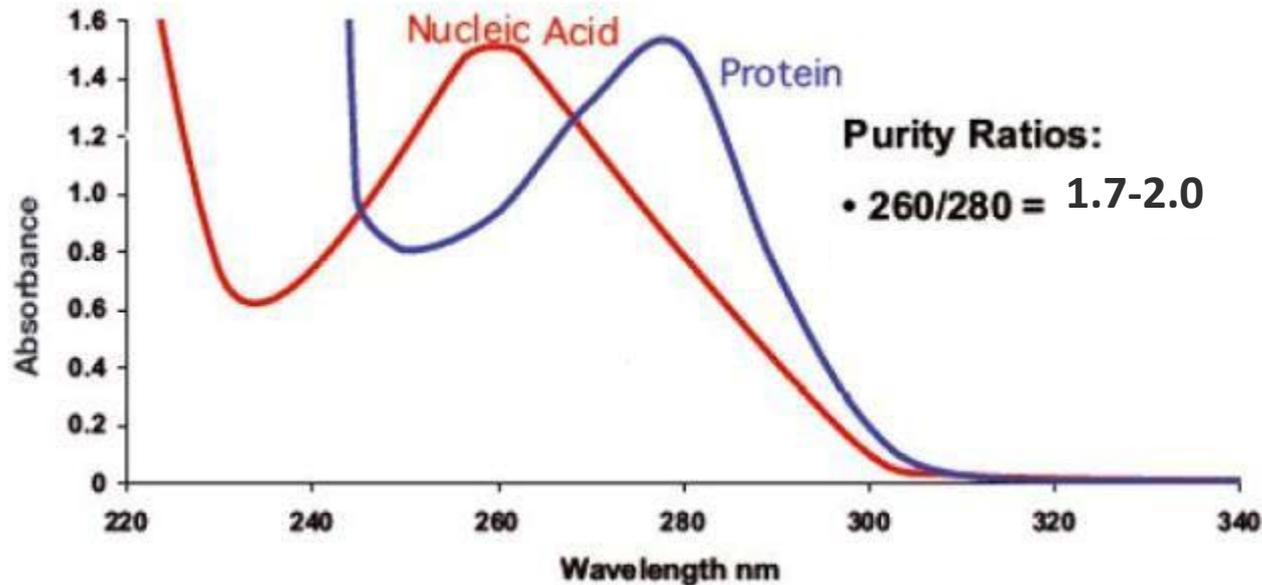
2.6.1.2. 抽取 DNA 法

採用適用於革蘭氏陰性細菌 DNA 抽取之市售套組，依套組操作說明步驟抽取 DNA。抽取之 DNA 溶液收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，作為檢體 DNA 原液，置於 -20°C 冷凍保存。

DNA條件

2.6.3. DNA 濃度測定及純度判斷

取適量之檢體 DNA 原液，以無菌去離子水做適當倍數之稀釋，分別測定 260 nm 及 280 nm 之吸光值(O.D.)。以波長 260 nm 吸光值乘 50 ng/μL 及稀釋倍數，即為檢體 DNA 原液濃度。DNA 溶液純度則以 $O.D._{260}/O.D._{280}$ 比值作判斷，其比值應介於 1.7 ~ 2.0。



引子及探針設計

2.3.2.1.1. 沙門氏桿菌鑑別基因(標的基因：*invA*)

引子 F：5'- CAA CGT TTC CTG CGG TAC TGT -3'

引子 R：5'- CCC GAA CGT GGC GAT AAT T - 3'

探針 P：

5'-(FAM)- CTC TTT CGT CTG GCA TTA TCG ATC
AGT ACC A -(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 116 bp

合成之引子及探針，拆封後，以無菌去離子水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20°C貯存備用，另探針需避光保存，探針 5'端採用 6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用 Black Hole Quencher-1 (BHQ1)標記。

反應條件

2.5. Real-time PCR 溶液^(註 4)

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 鑑別試驗用

5 μ M 引子 F 2.0 μ L

5 μ M 引子 R..... 2.0 μ L

10 μ M 探針..... 0.5 μ L

TaqMan® Fast Reagents Starter Kit..... 13.0 μ L

檢體 DNA 溶液..... 2.0 μ L

無菌去離子水 5.5 μ L

總體積 25.0 μ L

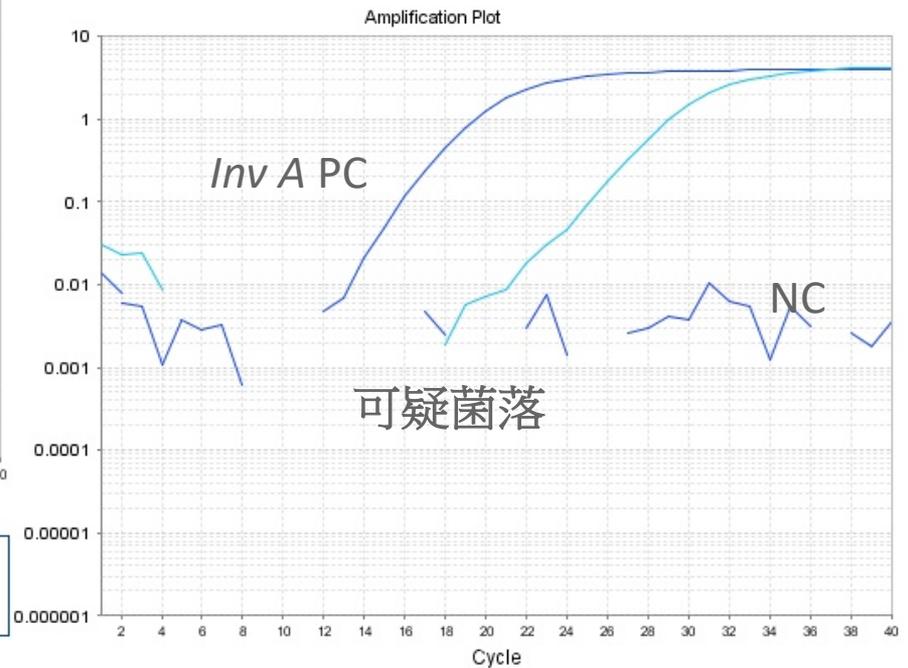
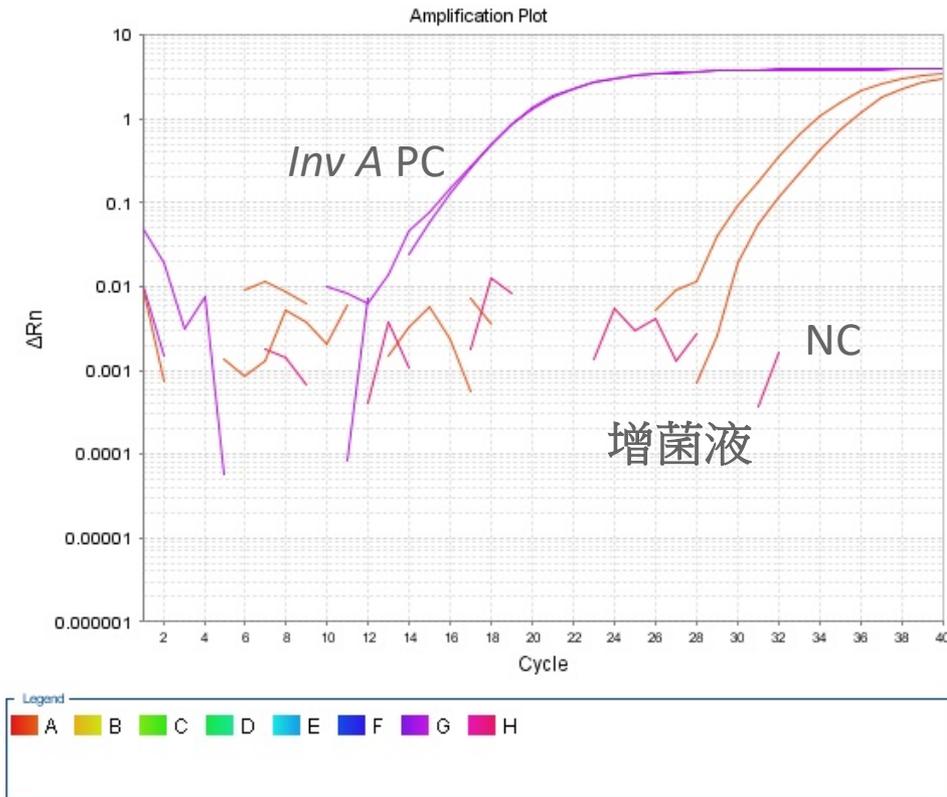
註 4：Real-time PCR 溶液應置於冰浴中配製。

2.7.1.1. 沙門氏桿菌菌屬鑑別基因反應條件

步驟	溫度	時間
1. 熱活化	95°C	20 sec
2. 最初變性	95°C	15 sec
3. 黏接、延展	60°C	30 sec

步驟 2 至步驟 3，共進行 40 個循環反應。

反應結果



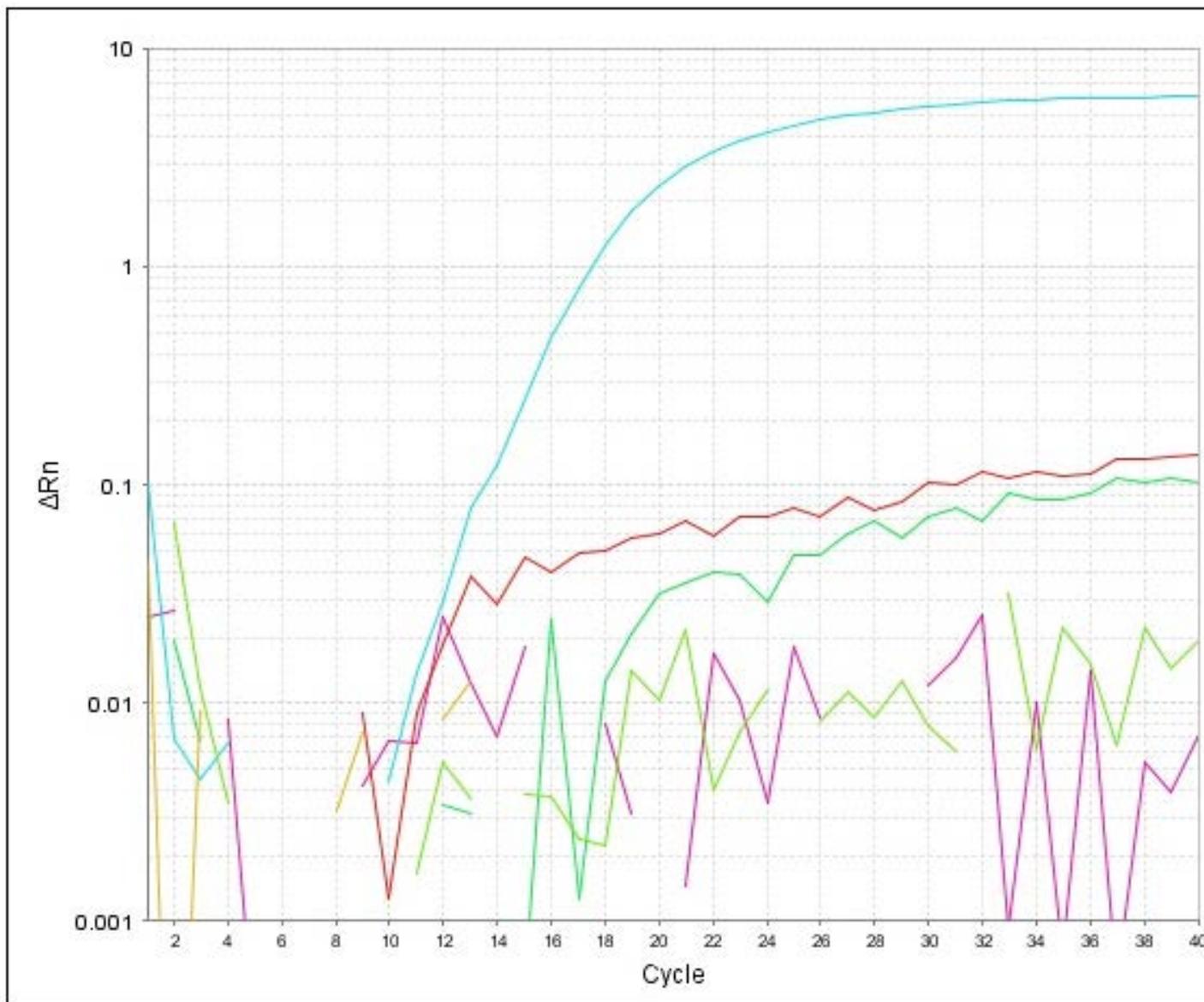
註4：可依檢體含菌量情況自行探討接續 real-time PCR 之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。

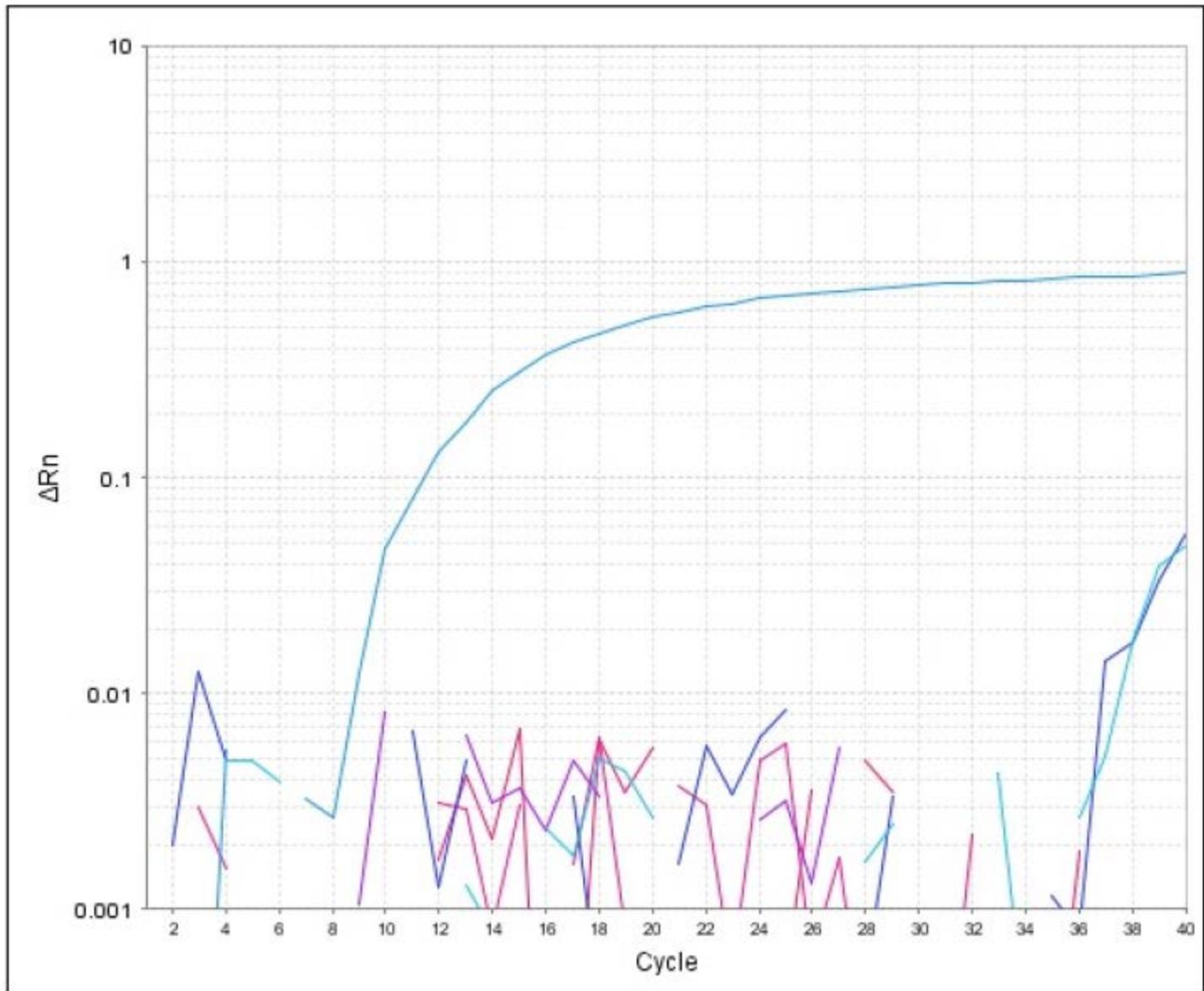
Trouble Shooting

Q: 沒訊號??

Q: 曲線圖很??

Q: Ct 值很低，不確定?





PCR inhibitors:

Hemoglobin, Urea, Heparin
Organic or phenolic compounds
Glycogen, Fats, Ca²⁺
Tissue matrix effects
Laboratory items, powder, etc.

PCR enhancers:

DMSO, Glycerol, BSA
Formamide, PEG, TMANO, TMAC etc.
Special commercial enhancers:
Gene 32 protein, Perfect Match, Taq Extender,
E.Coli ss DNA binding

real-time PCR efficiency

DNA
degradation

Tissue
degradation

unspecific
PCR products

Lab management

DNA dyes

Cycle conditions

DNA
concentration

PCR reaction
components

Hardware:
PCR platform & cups

操作注意事項

- ◆ 水很重要
- ◆ 水 & 試劑要分裝且避免重複解凍
- ◆ 手避免從反應盤上空飛過
- ◆ 一定要做正/負控制組
- ◆ 每個反應最好做2-3重複
- ◆ 最好用 filter tip
- ◆ 最好用一套獨立 pippetman

Thank You ~~~

.....



衛生福利部
食品藥物管理署
Food and Drug Administration