

食品中病原性微生物之 Real-time PCR檢測

講者:袁巧璇 技佐



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

 金黃色葡萄球菌及單核球增多性
李斯特菌檢驗方法介紹

— The Nobel Prize in — Chemistry 1993



Kary B. Mullis

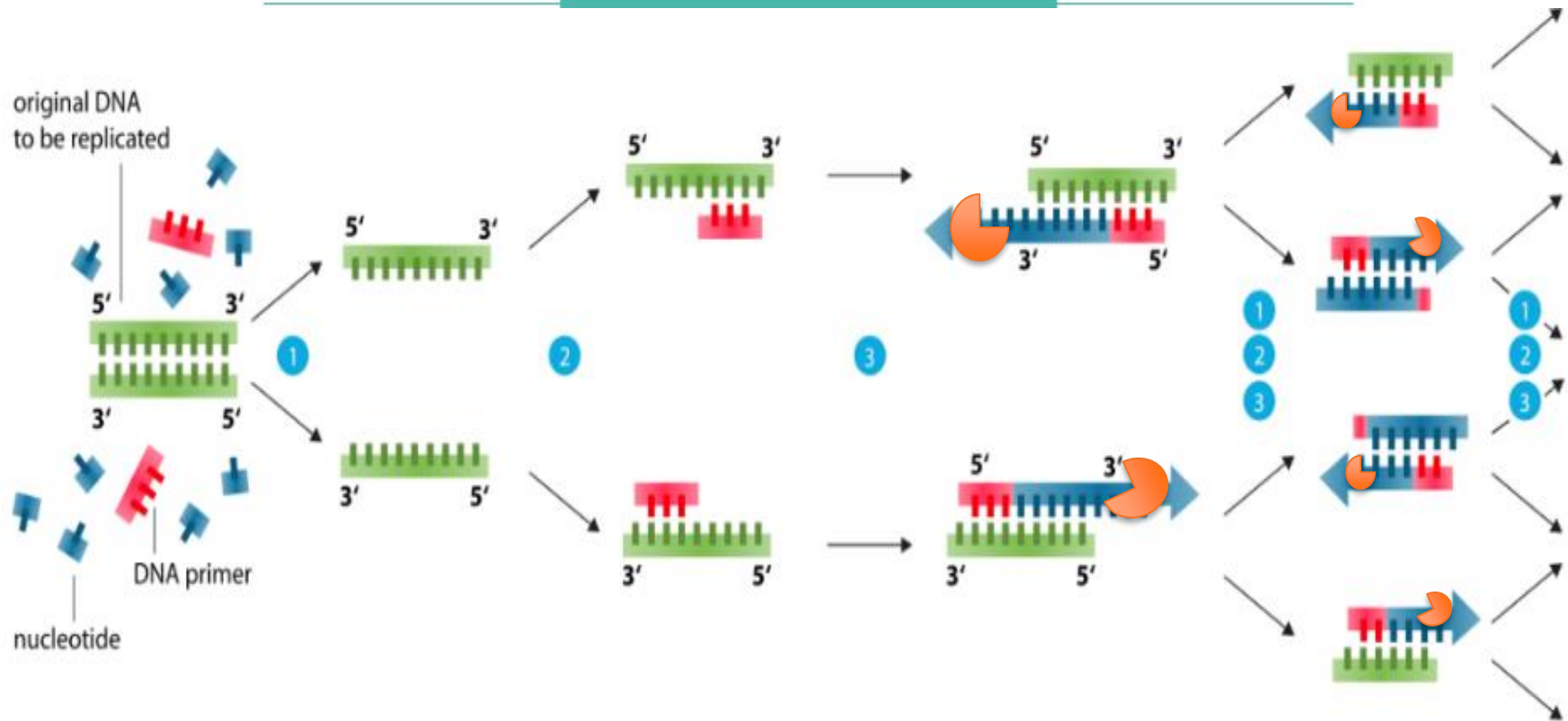
Prize share: 1/2



Michael Smith

Prize share: 1/2

PCR-Polymerase chain reaction

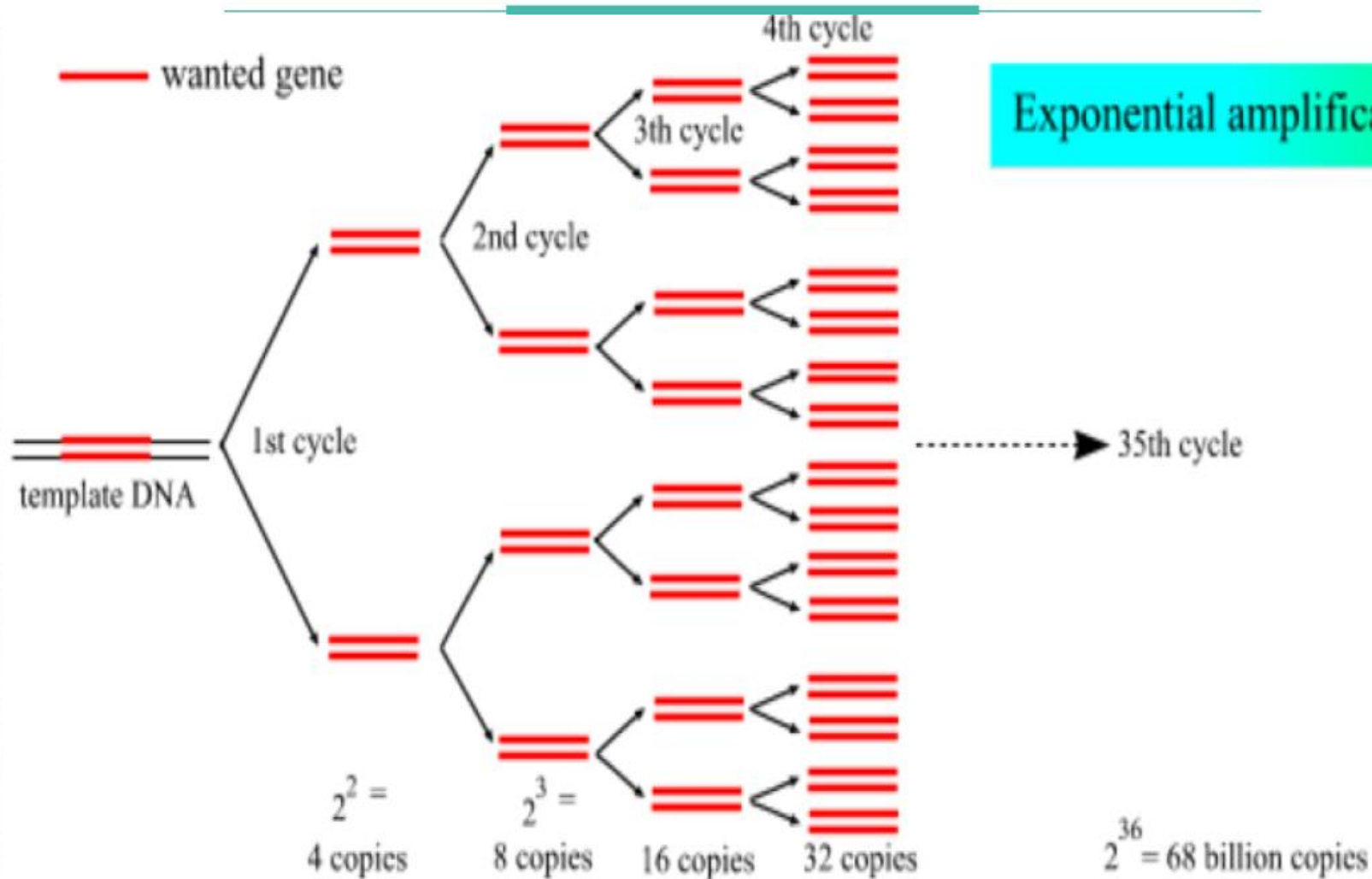


1 Denaturation at 94-96°C

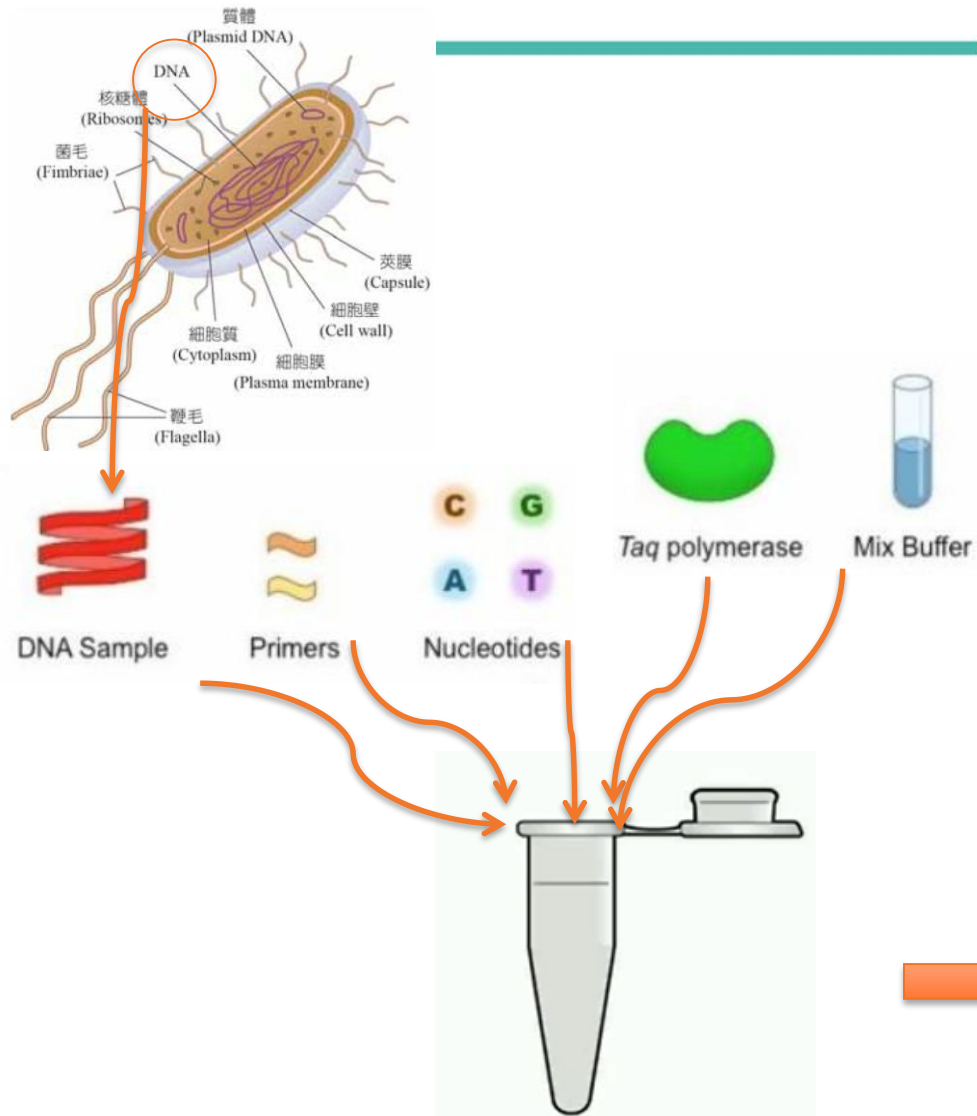
2 Annealing at ~68°C

3 Elongation at ca. 72 °C

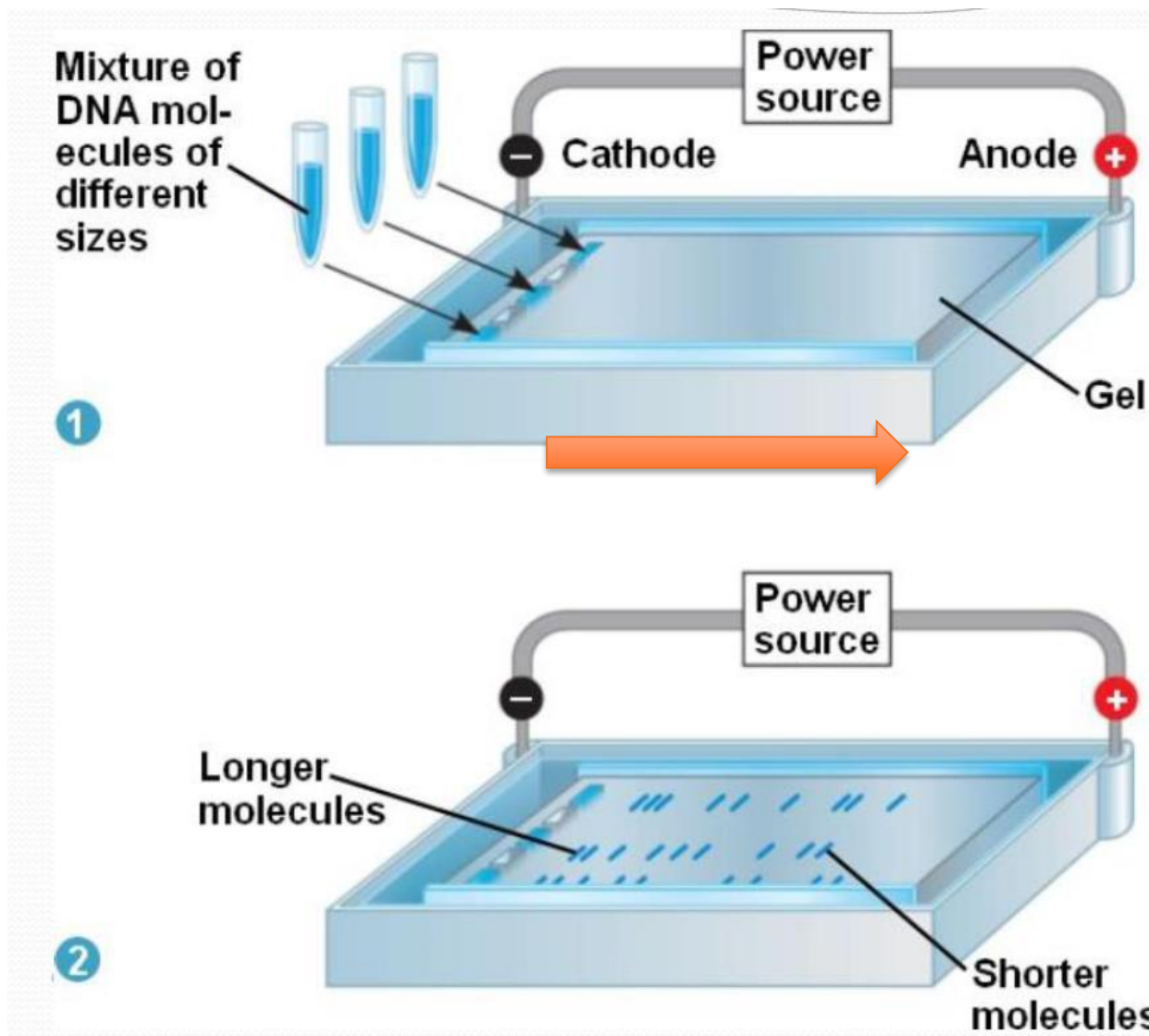
 polymerase



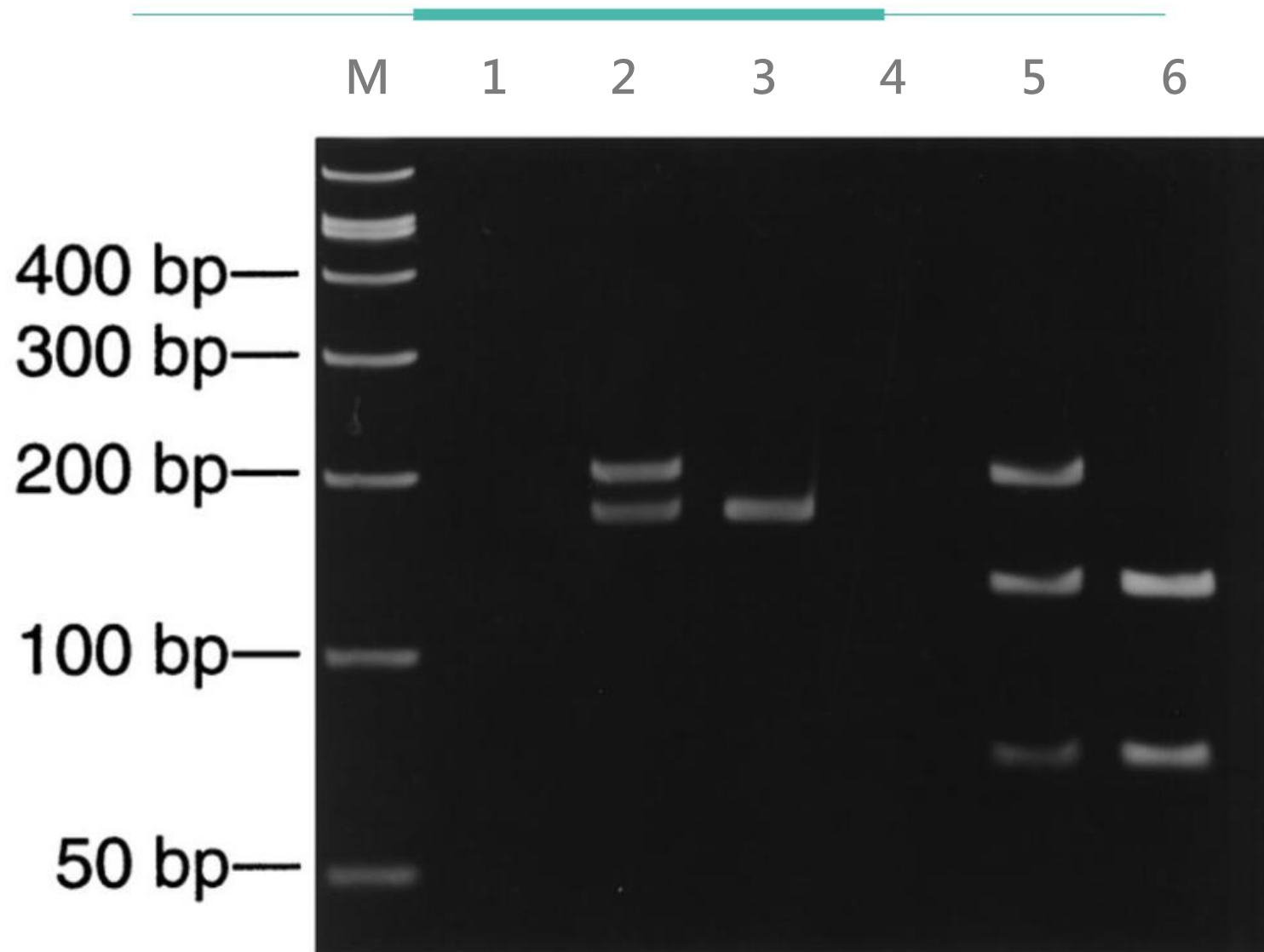
PCR



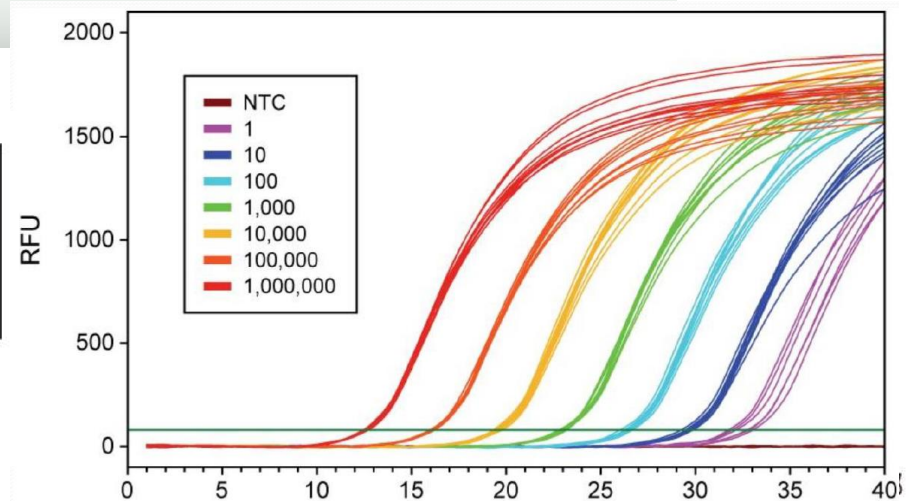
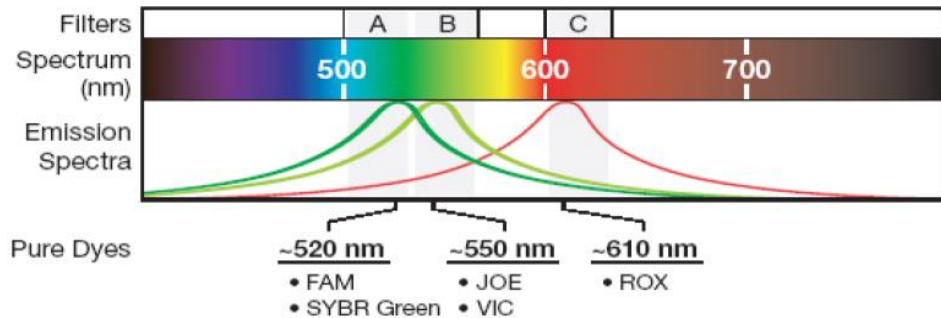
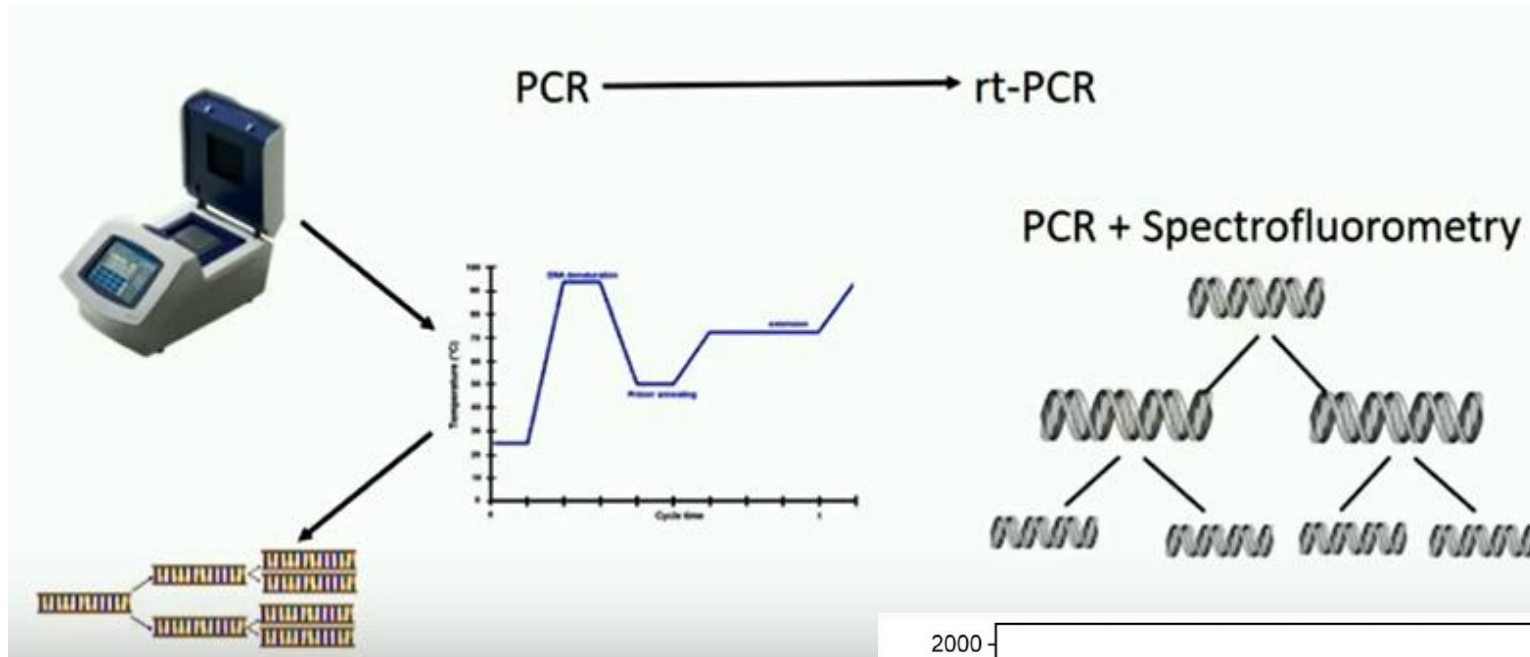
膠體電泳



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
結果判定	電泳膠片 (band) (end-point)	螢光反應曲線 (即時)
反應時間	較長	較短

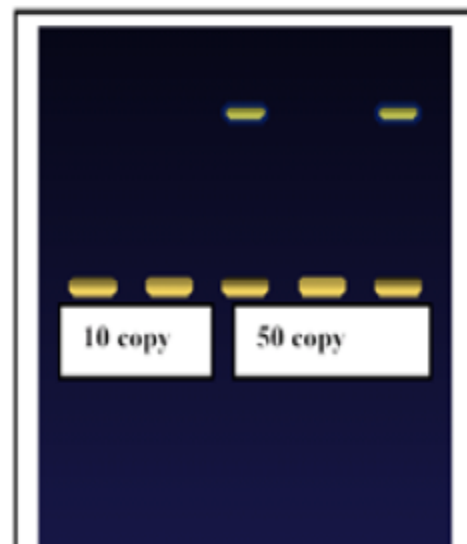
Log [DNA]

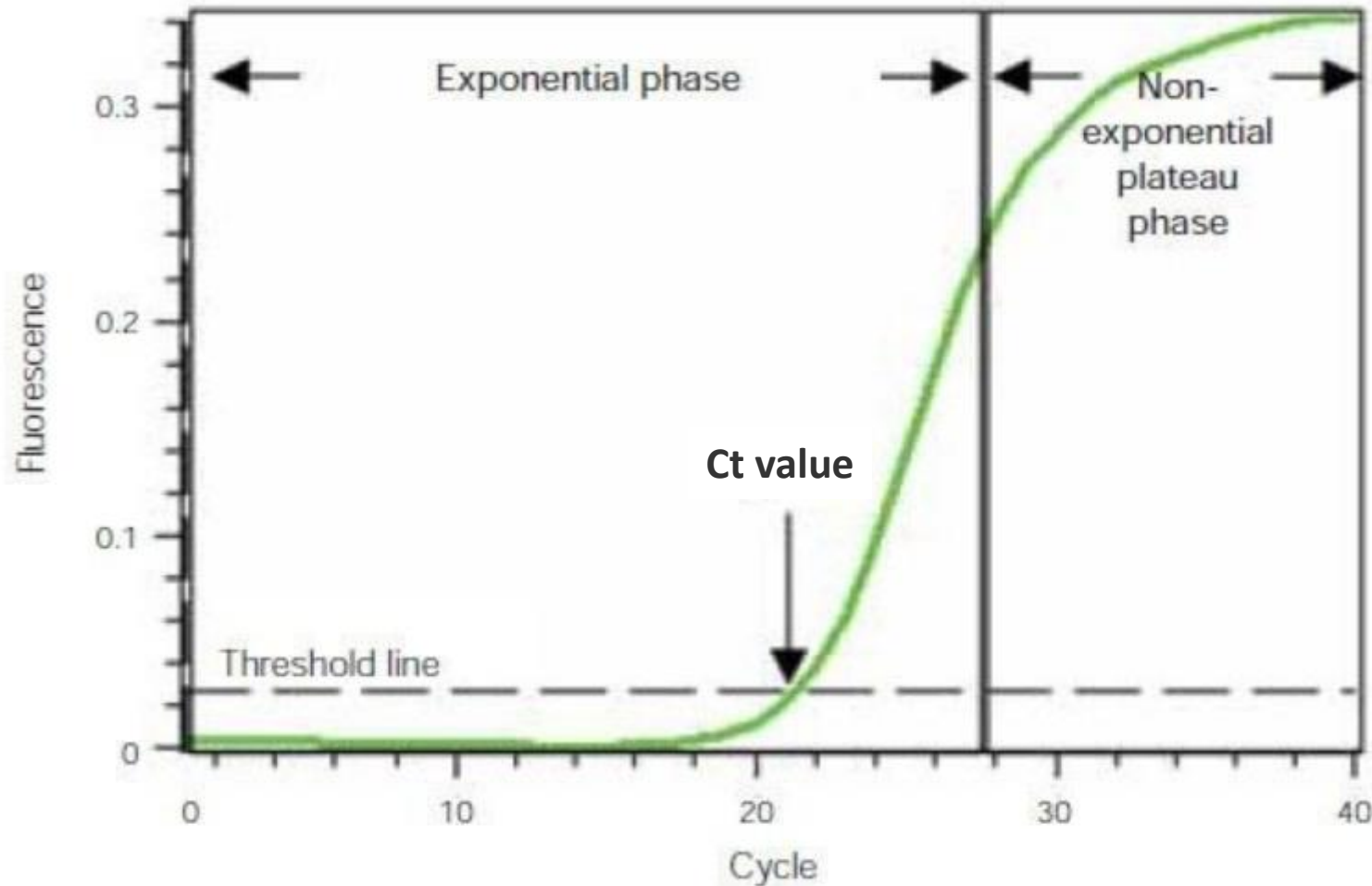
Plateau

Geometric

$$Y=X2^n$$

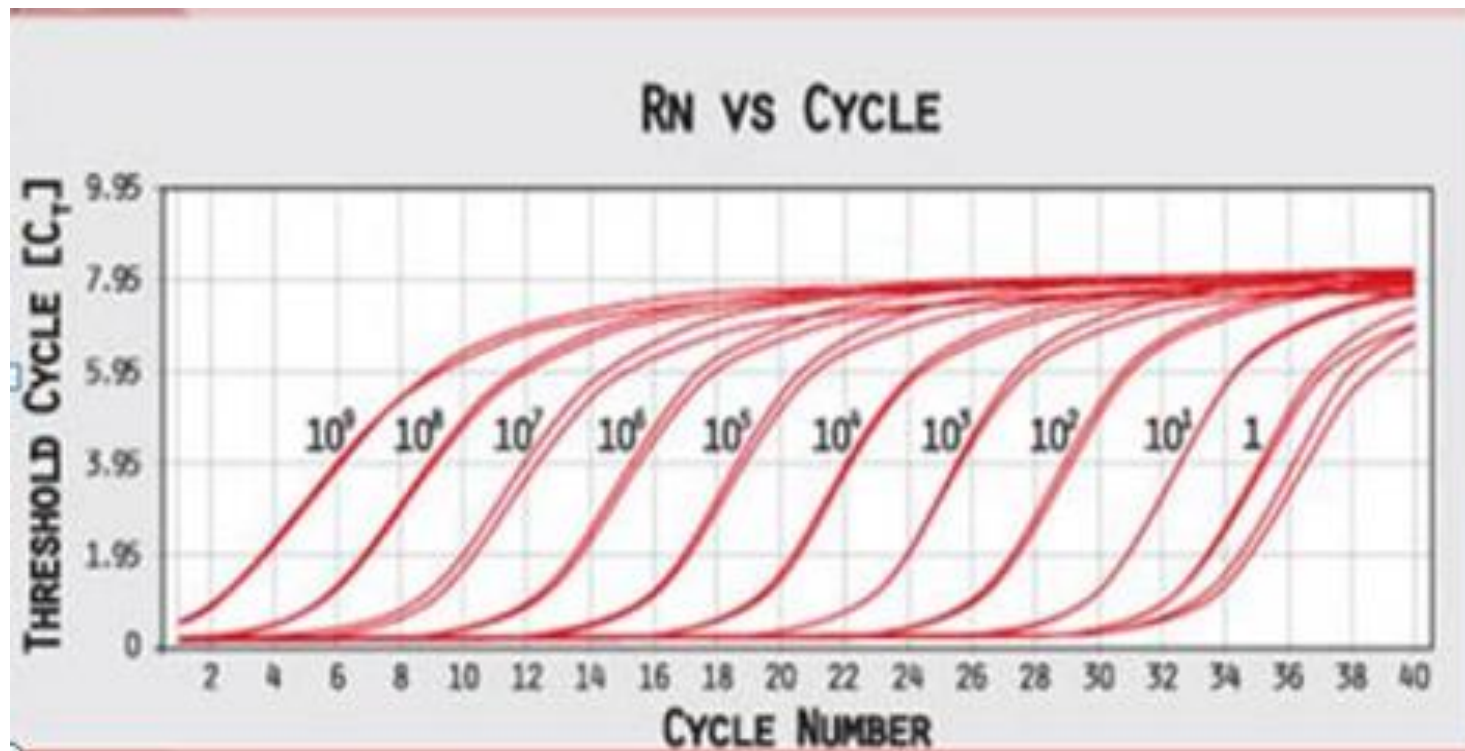
Cycle #



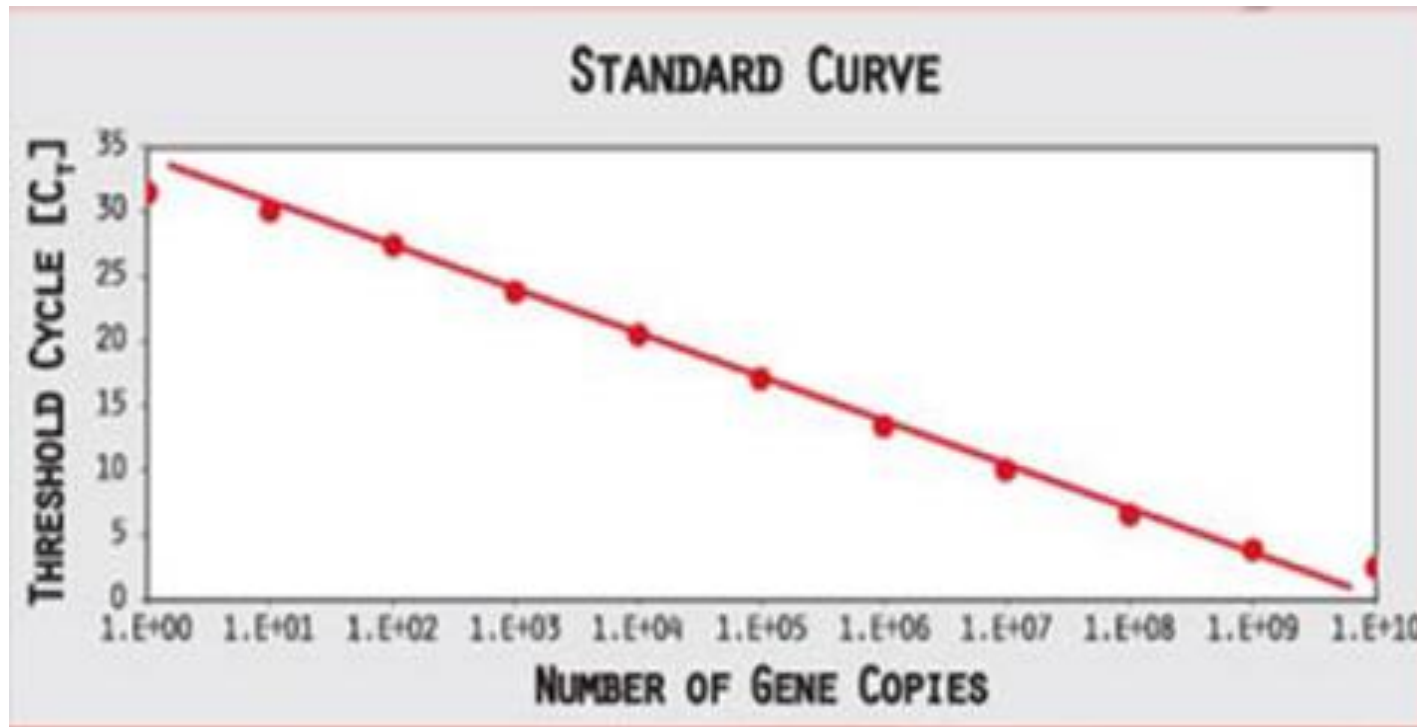


當螢光值達到偵測之閾值(Threshold)，此時所對應的循環數(cycle)稱之為Ct值。

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C_t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



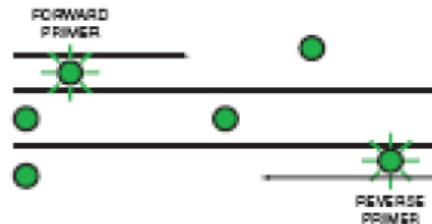
Step 1: Reaction setup

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



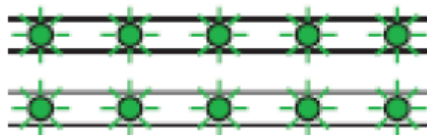
Step 2: Denaturation

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.

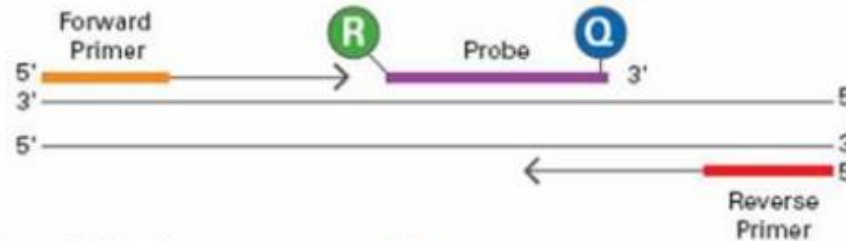
DNA binding dye-SYBR Green

- 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

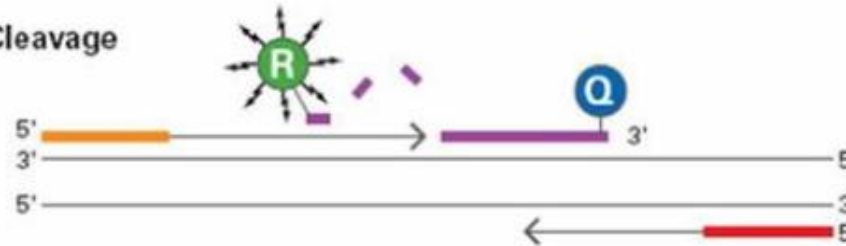
R = Reporter
Q = Quencher



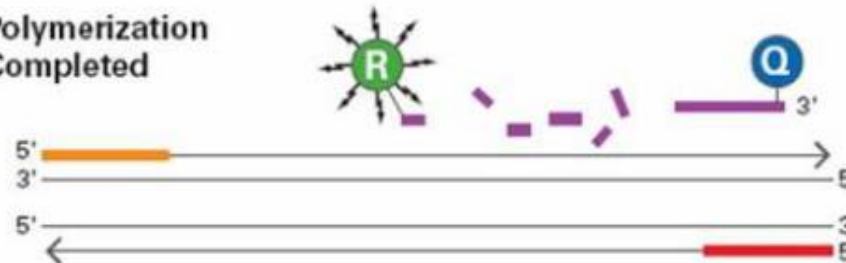
Strand Displacement



Cleavage



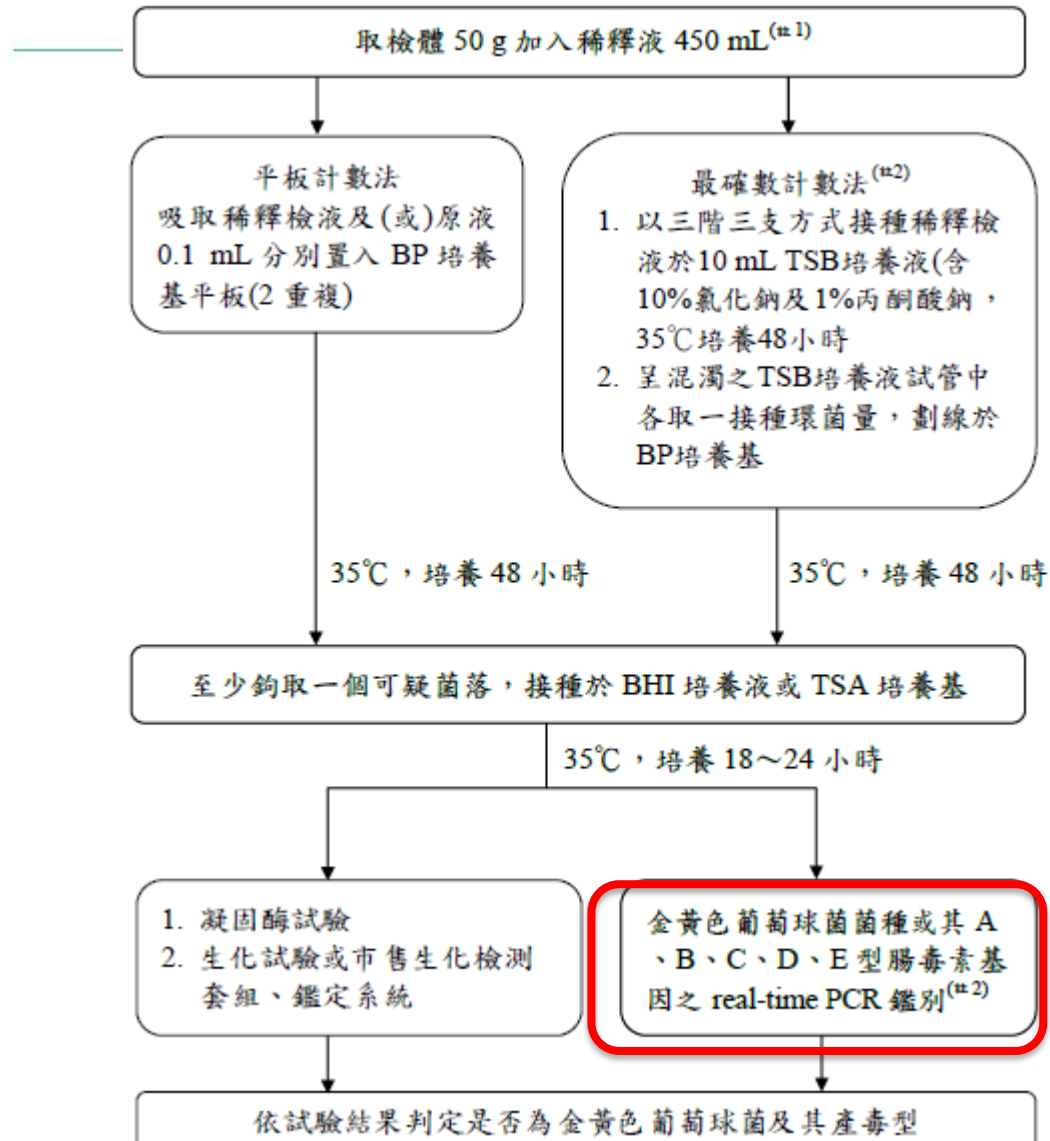
Polymerization Completed



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，

金黃色葡萄球菌檢驗流程圖

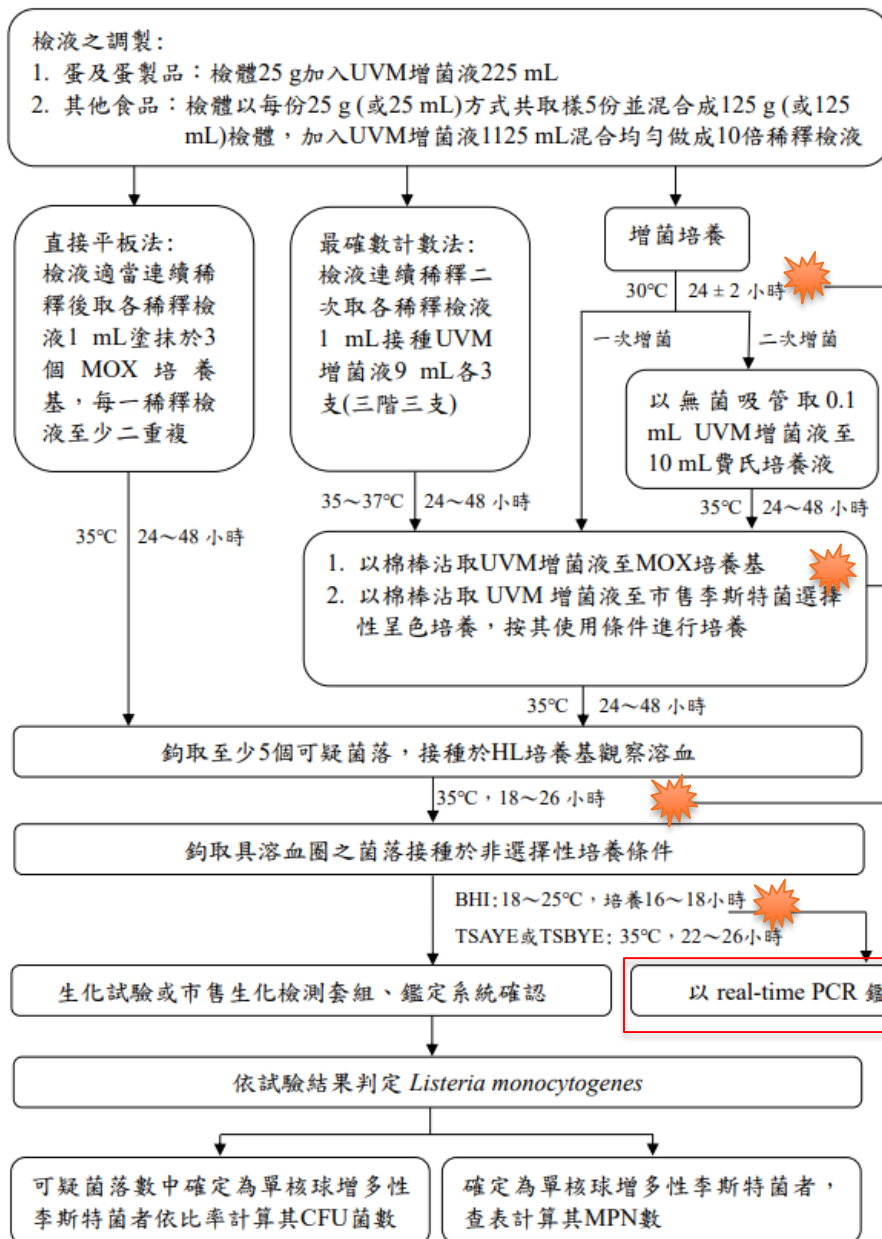


可依檢體含菌量情況自行探討接續 real-time PCR 之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。



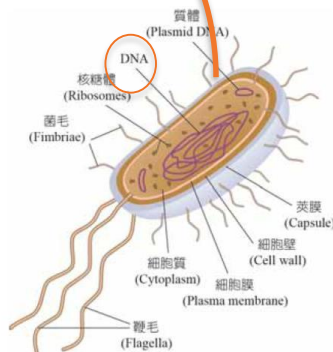
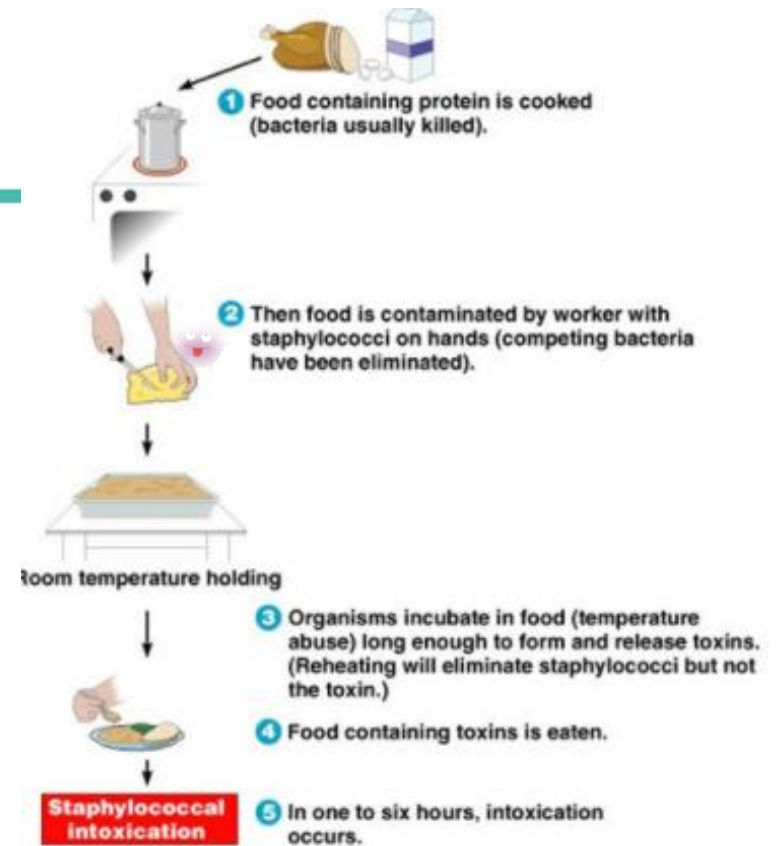
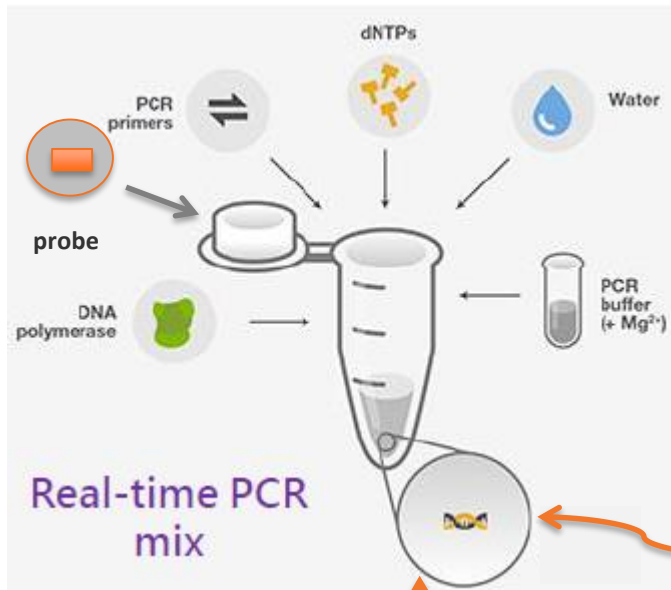
衛生福利部
食品藥物管理署
Food and Drug Administration

單核球增多性李斯特菌檢驗流程圖

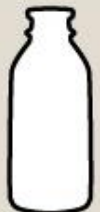


可依檢體含菌量情況自行探討接續 real-time PCR 之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。

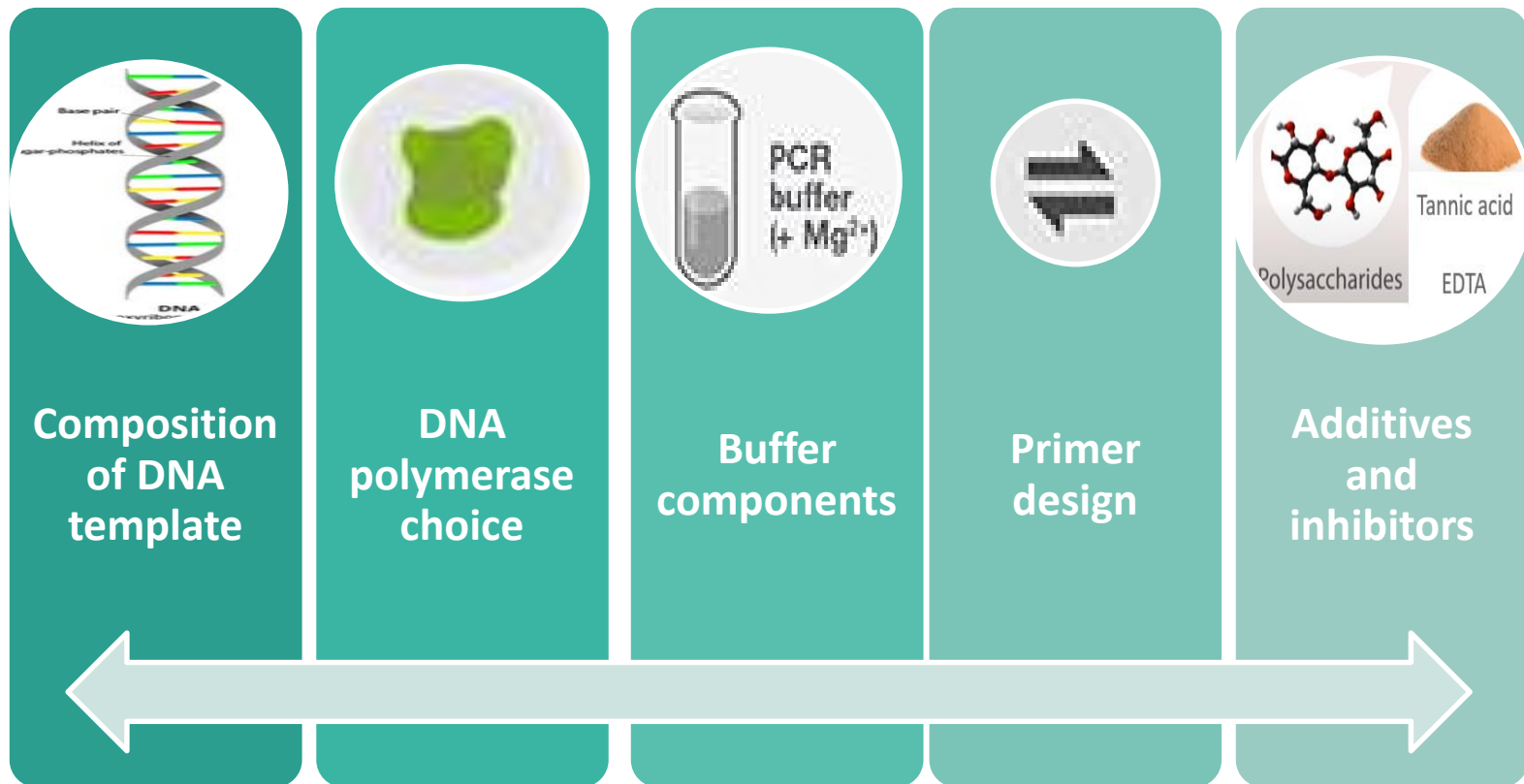




Listeria can hide in many foods



Important factors in PCR



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 ×g離心3分鐘，去除上清液，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，於-20℃冷凍保存。

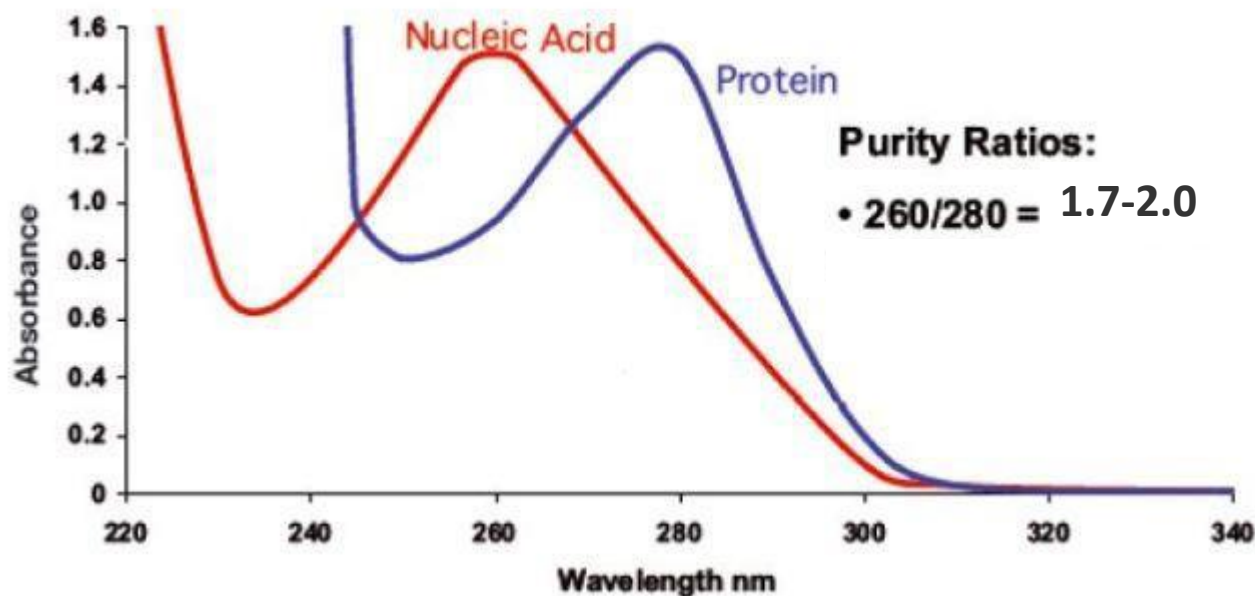
2.6.1.2. 抽取DNA法

採用適用於革蘭氏陽性細菌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，於-20℃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

探針5'端採用6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用Black Hole Quencher-1 (BHQ1)或Minor Groove Binder (MGB)標記。

2.3.2.1.1. 金黃色葡萄球菌 菌種鑑別基因(標的基因：*nuc*)

引子F：5'-AAATTACATAAAGAACCTGCGACA-3'

引子R：5'-GAATGTCATTGGTTGACCTTTGTA-3'

探針P：5'-(FAM)-AATTTAACCGTATCACCATCAAT
CGCTTT-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小64 bp

金黃色葡萄球菌A型腸毒素鑑別基因(標的基因：*entA*)

引子F：5'-TTTGGAACGGTTAAAACGAATAAG-3'

引子R：5'-TTTCCTGTAAATAACGTCTTGCTTGA-3'

探針P：5'-(FAM)-CTGTTCAGGAGTTGGATC-(MGB)-3'

PCR增幅產物大小80 bp

金黃色葡萄球菌B型腸毒素鑑別基因(標的基因：*entB*)

引子F：5'-AGGTGACTGCTCAAGAATTAGATTACC-3'

引子R：5'-AAGGCGAGTTGTTAAATTCATAGAGTT-3'

探針P：5'-(FAM)-AACTCGTCACTATTTGGTG-(MGB)-3'

PCR增幅產物大小84 bp

引子及探針設計

金黃色葡萄球菌C型腸毒素鑑別基因(標的基因：entC)

引子F：5'-GGCGATAAGTTTGACCAATCTAAATAT-3'

引子R：5'-AAGGTGGACTTCTATCTTCACACTTTT-3'

探針P：5'-(FAM)-TGTACAACGACAATAAA-(MGB)-3'

PCR增幅產物大小90 bp

金黃色葡萄球菌D型腸毒素鑑別基因(標的基因：entD)

引子F：5'-CACAAGCAAGGCGCTATTTG-3'

引子R：5'-TCGGGAAAATCACCCCTTAACA-3'

探針P：5'-(FAM)-ATACAGCGCGGAAA-(MGB)-3'

PCR增幅產物大小151 bp

金黃色葡萄球菌E型腸毒素鑑別基因(標的基因：entE)

引子F：5'-CTTTGGCGGTAAGGTGCAA-3'

引子R：5'-ACCGTGGACCCTTCAGAAGA-3'

探針P：5'-(FAM)-AGGCTTGATTGTGTTTCA-(MGB)-3'

PCR增幅產物大小60 bp



引子及探針設計

2.3.2.1 鑑別試驗用引子及探針

2.3.2.1.1. Listeria monocytogenes (標的基因：*iap* gene)

引子F：Lm835F

5'-AACTGGTTTCGTTAACGGTAAATACTTA-3'

引子R：Lm998R

5'-TAGGCGCAGGTGTAGTTGCT-3'

探針P：Lm918P

5'-FAM-CTACTACTCAACAAGCTGCACCTGCTGC-BHQ-3'

PCR增幅產物大小163 bp

Listeria spp. (標的基因：*iap* gene)

引子F：Lal1055F

5'-GTTAAAAGCGGTGACACTATTTGG-3'

引子R：Lal1163R

5'-TTTGACCTACATAAATAGAAGAAGAAGATAA-3'

探針P：Lal1118P

5'-FAM-ATGTCATGGAATAAT-MGB-3'

PCR增幅產物大小108 bp

金黃色葡萄球菌反應條件

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
5 μ M探針.....	1.5 μ L
TaqMan® Fast Reagents Starter Kit.....	12.5 μ L
檢體DNA溶液.....	5.0 μ L
無菌去離子水	2.0 μ L
總體積	25.0 μ L

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℃貯存備用，另探針需避光保存。

2.7.1.1. 金黃色葡萄球菌菌種鑑別基因及其A、B、C、D、E型腸毒素鑑別基因反應條件

步驟	溫度(°C)	時間(sec)
1. 熱活化	95	20
2. 最初變性	95	15
3. 黏接、延展	60	30
步驟2至步驟3，共進行45個循環反應。		



單核球增多性李斯特菌反應條件

2.5. Real-time PCR溶液^(註4)

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

5 µM引子F	2.0 µL
5 µM引子R.....	2.0 µL
5 µM探針.....	1.0 µL
TaqMan® Fast Reagents Starter Kit.....	12.5 µL
檢體DNA溶液.....	5.0 µL
無菌去離子水	2.5 µL
總體積.....	25.0 µL

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℃貯存備用，另探針需避光保存。

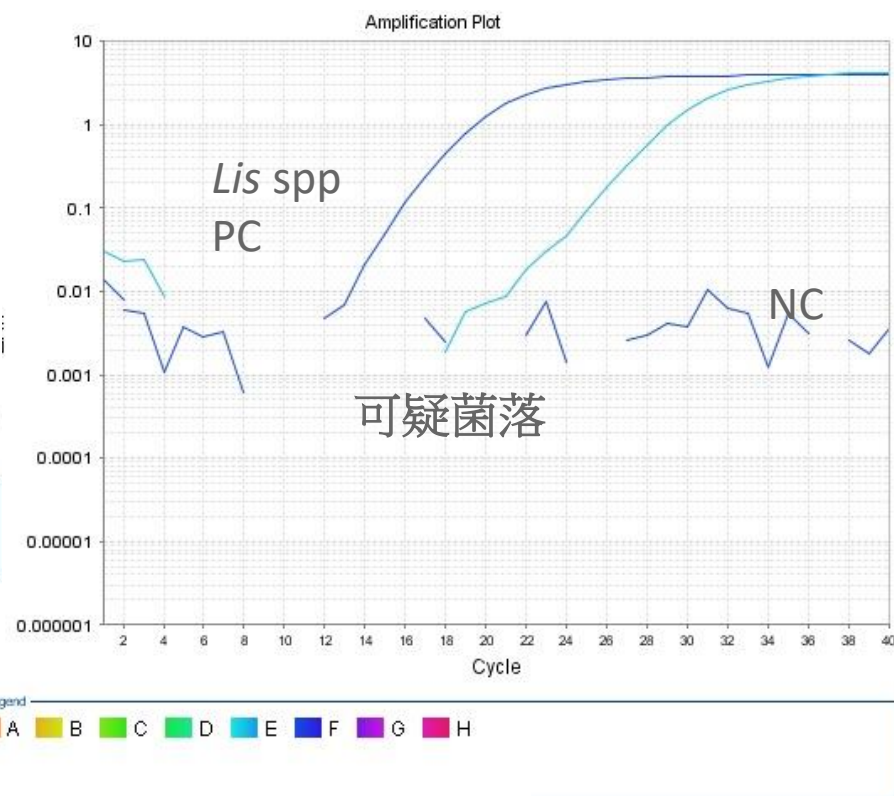
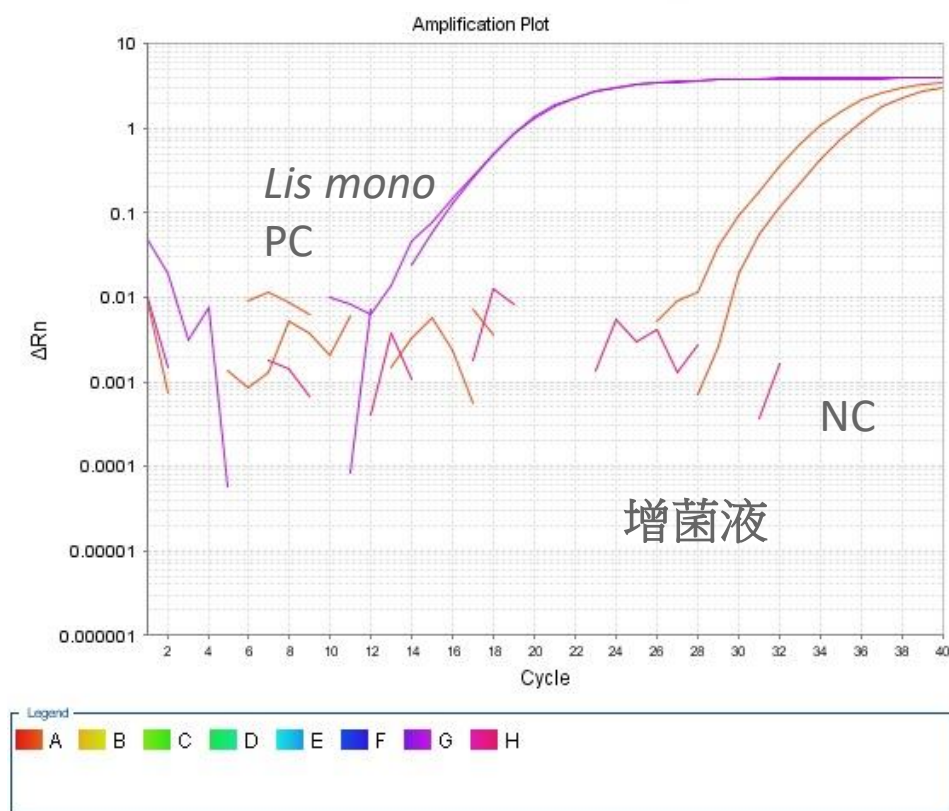
註4：Real-time PCR溶液應於冰浴中配製。

2.7.1.1. Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System反應條件

步驟	溫度(°C)	時間(sec)
1. 熱活化	95	20
2. 變性	95	5
3. 黏接		
<i>Listeria monocytogenes</i>	60	30
<i>Listeria spp.</i>	60	30

步驟2至步驟3，共進行45個循環反應。

反應結果

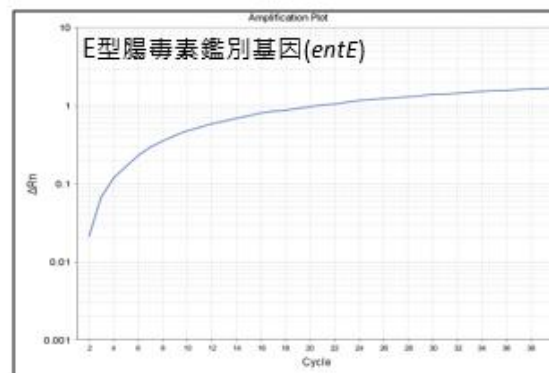
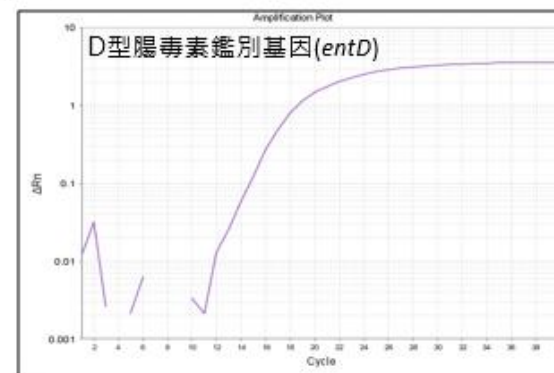
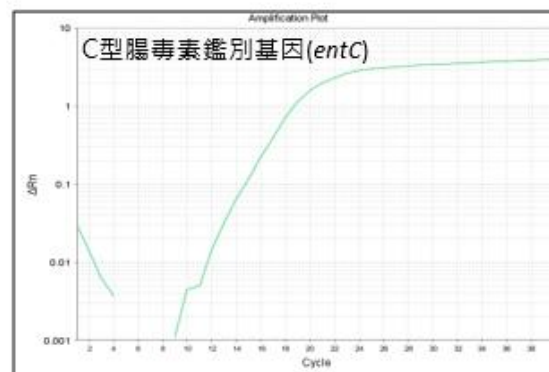
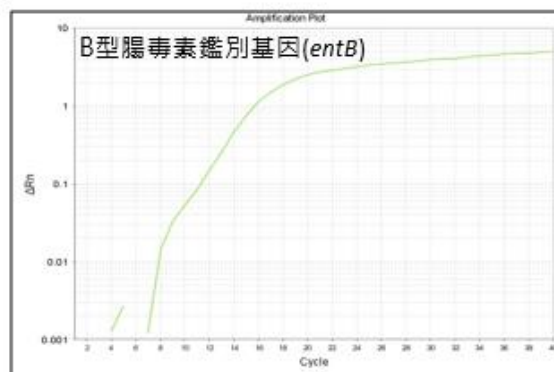
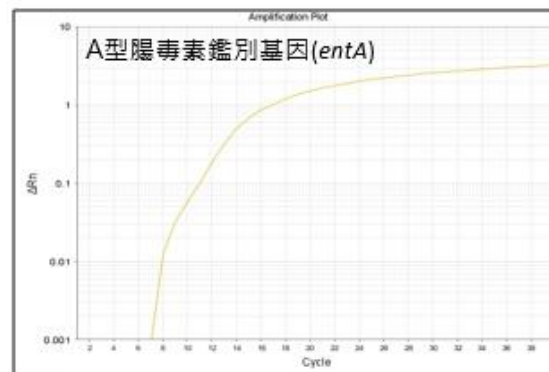
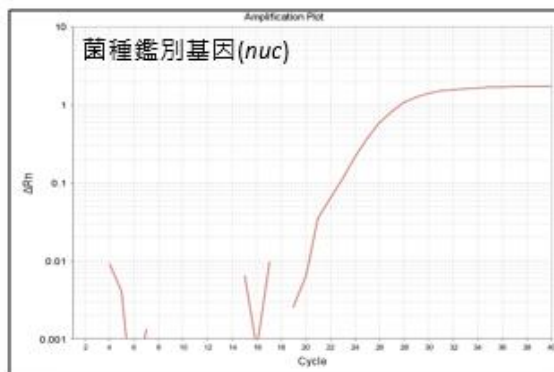


註4：可依檢體含菌量情況自行探討接續 real-time PCR 之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。



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

反應結果



Real-time PCR



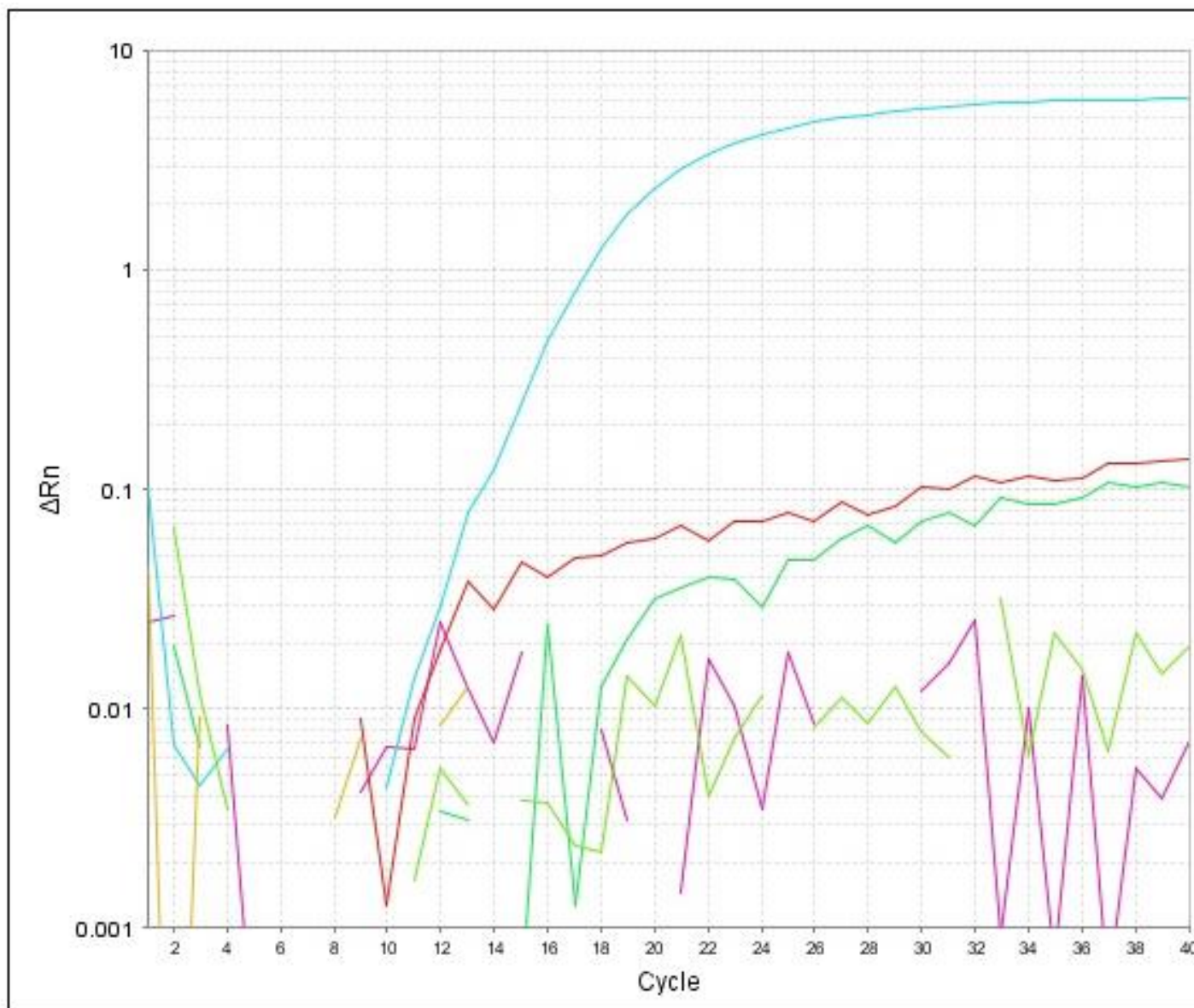
Trouble Shooting

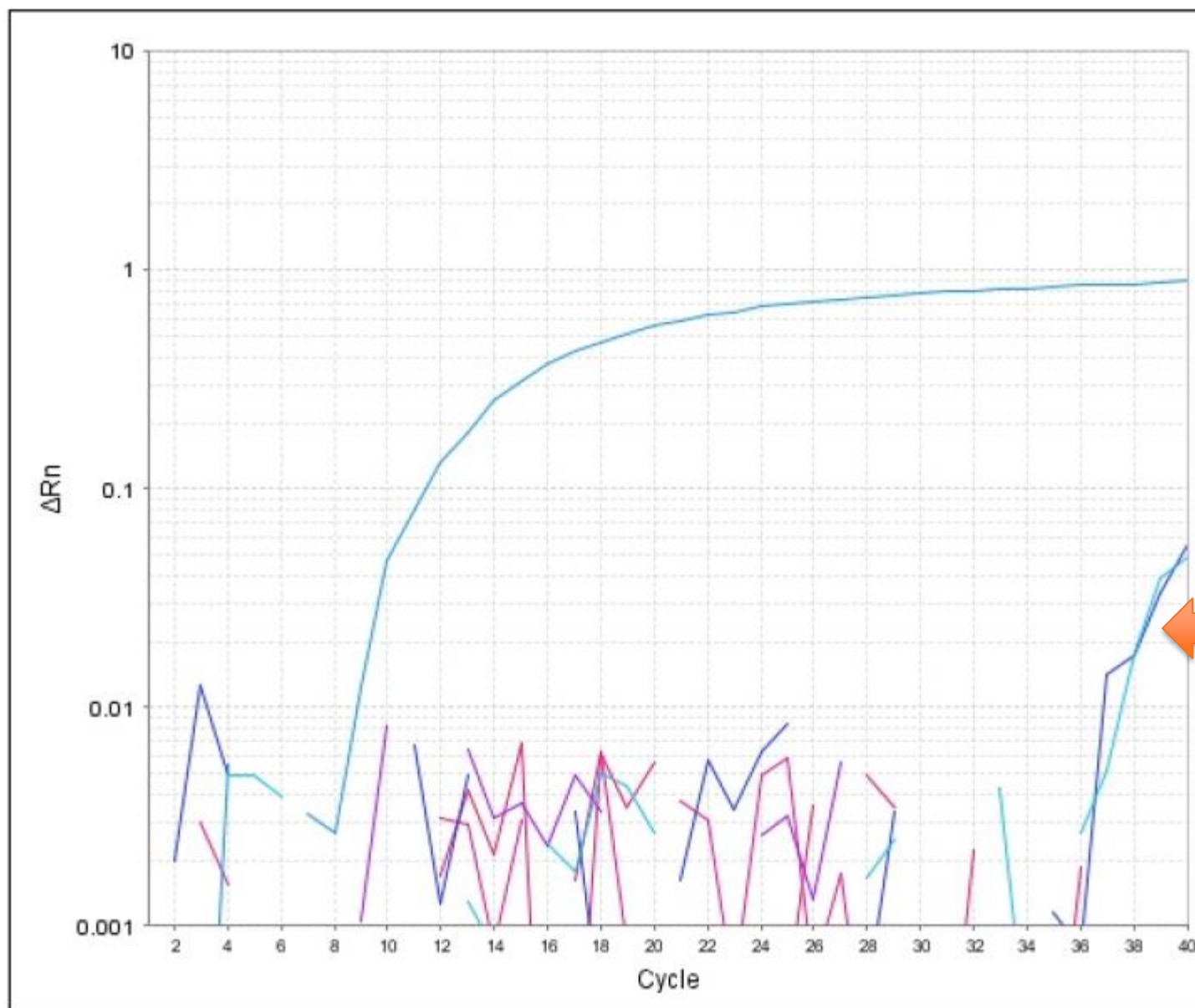
Q: 沒訊號??

Q: 曲線圖很??

Q: Ct 值很低，不確定?







PCR inhibitors:

Hemoglobin, Urea, Heparin
Organic or phenolic compounds
Glycogen, Fats, Ca^{2+}
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pippelman

Thank You ~ ~ ~



衛 生 福 利 部
食 品 藥 物 管 理 署
Food and Drug Administration

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