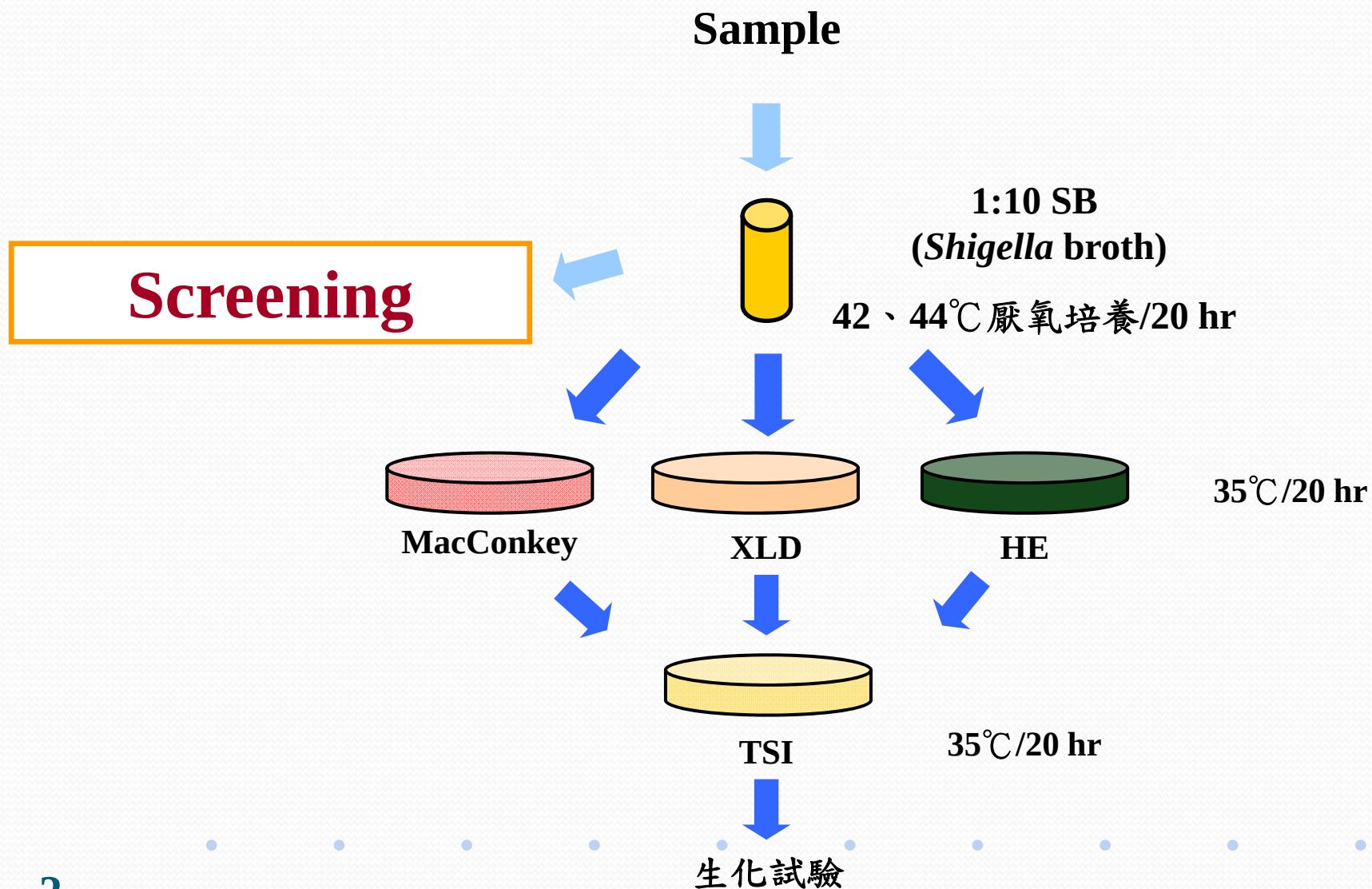


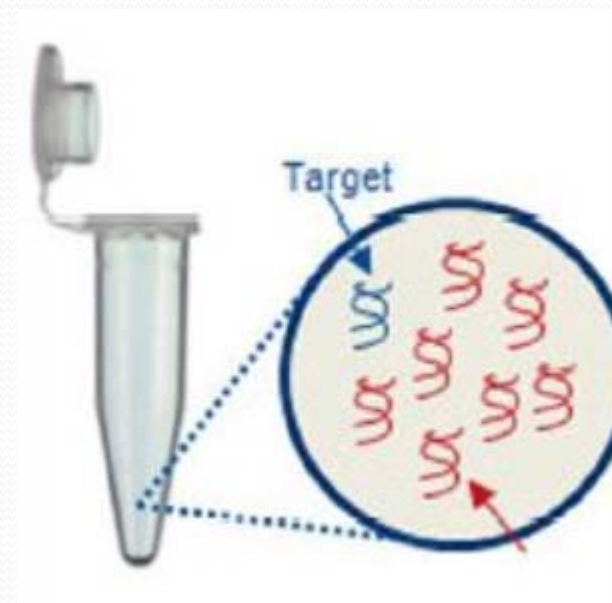
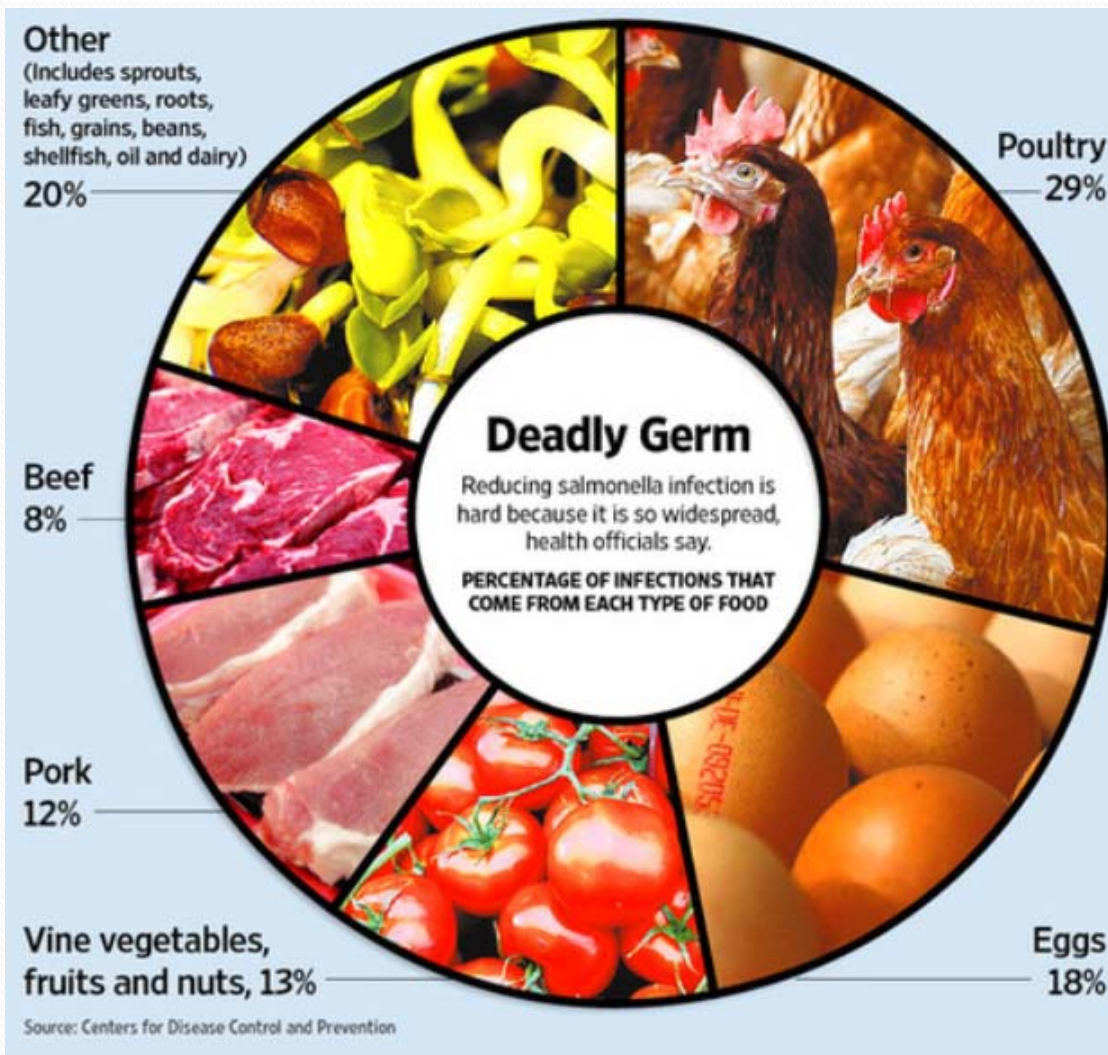


食品中志賀氏桿菌之快速檢 測方法開發

王鈺婷
104.11.26

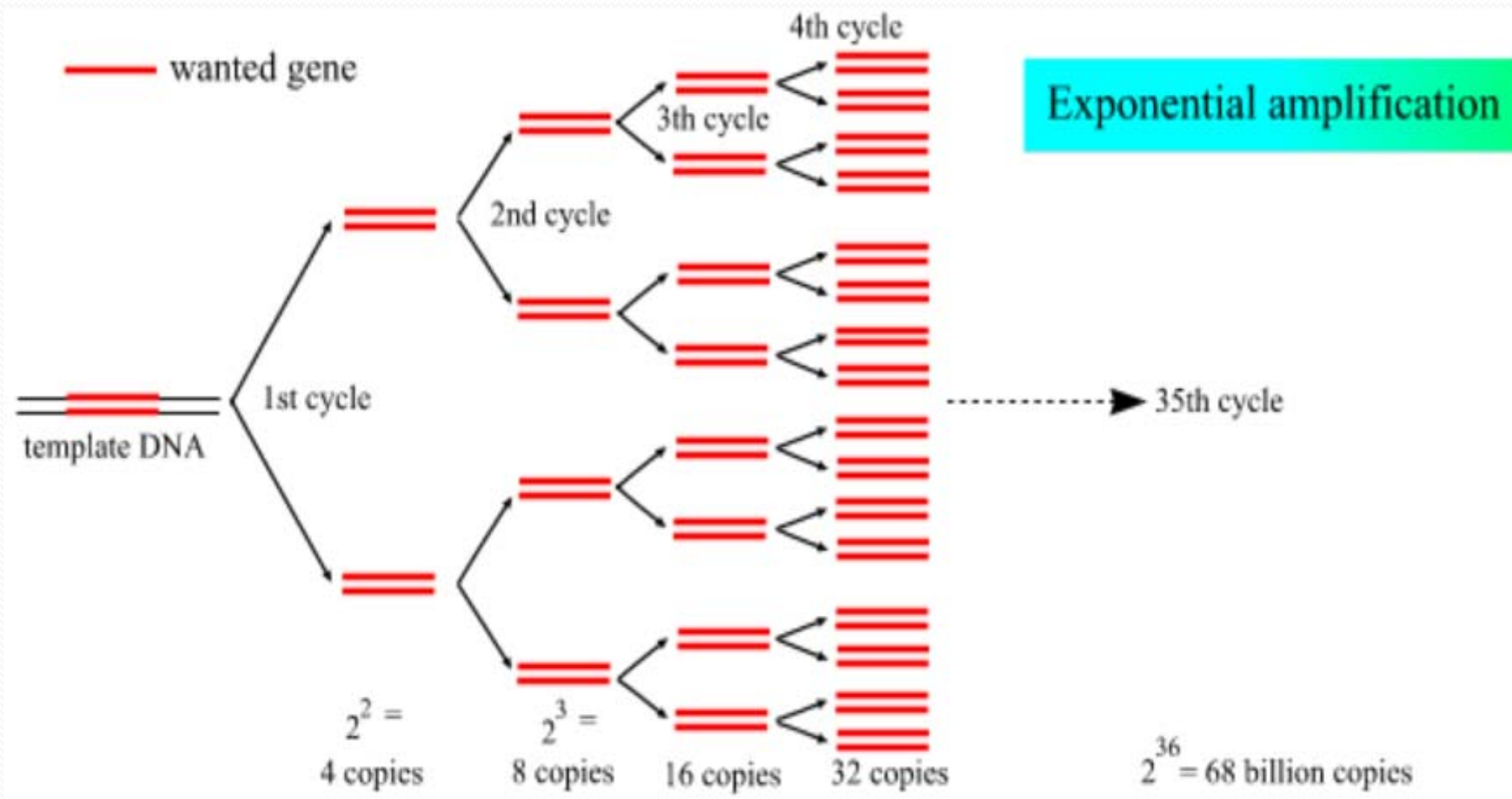
檢驗方法

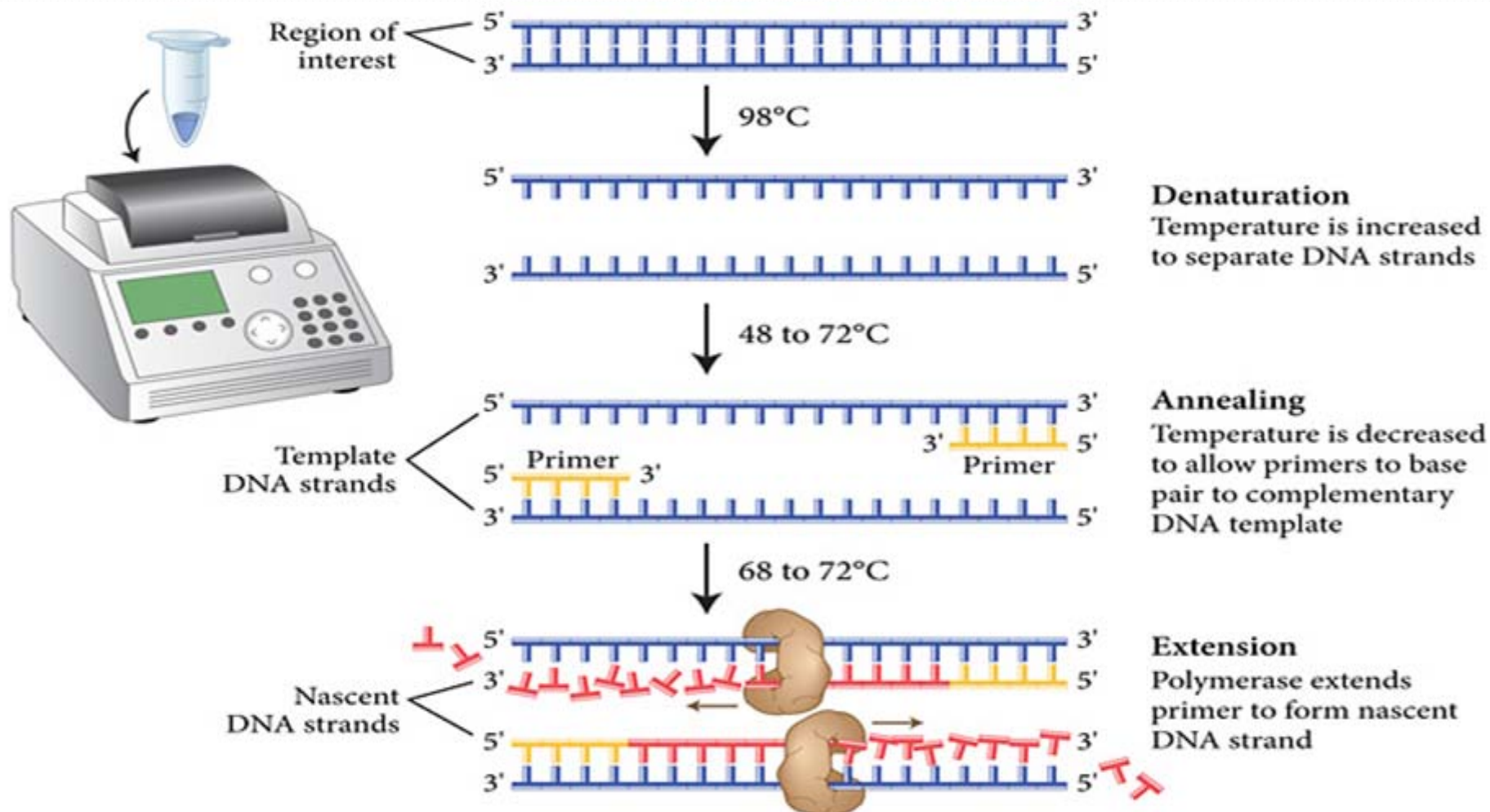




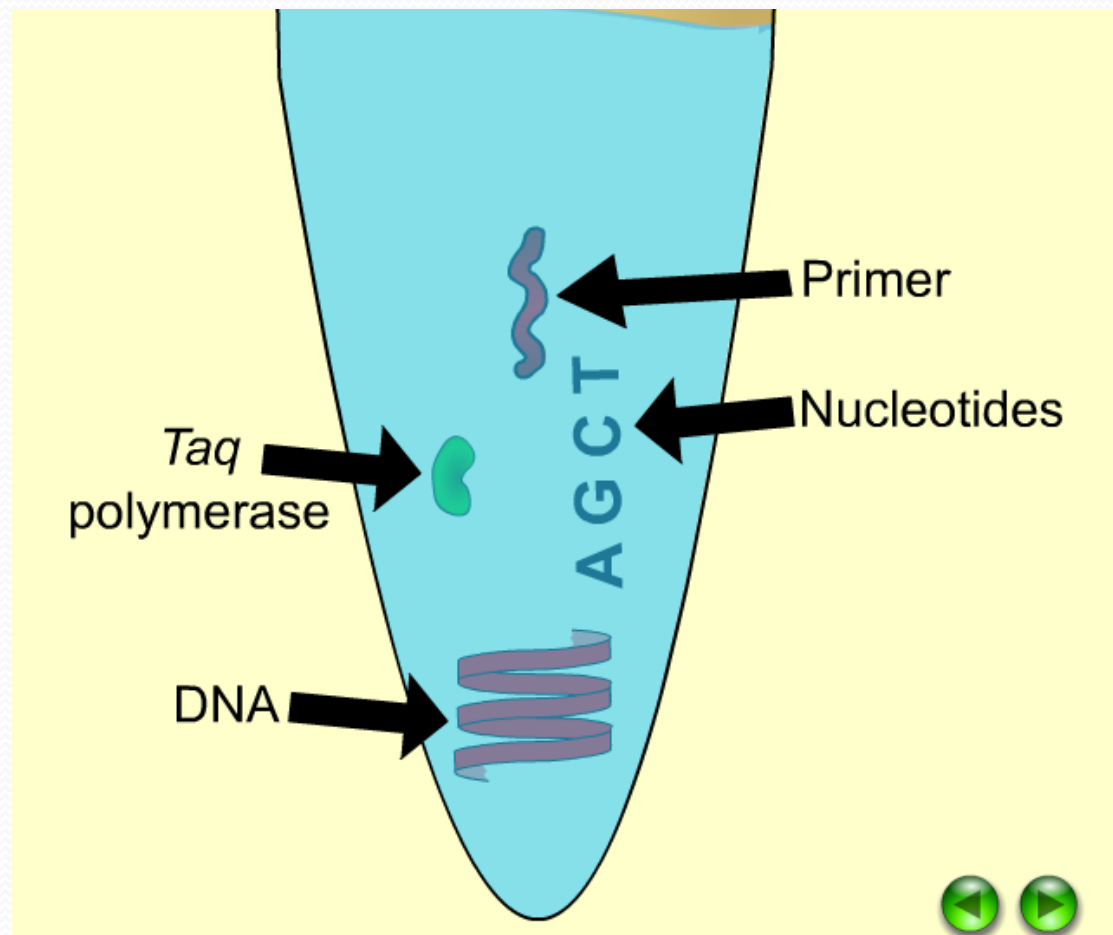
PCR

(Polymerase Chain Reaction)



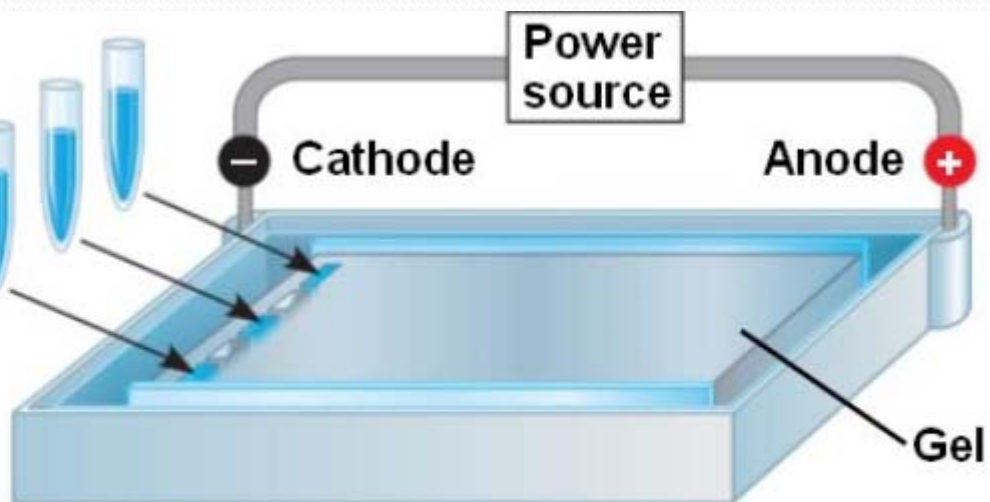


Critical for PCR Reaction

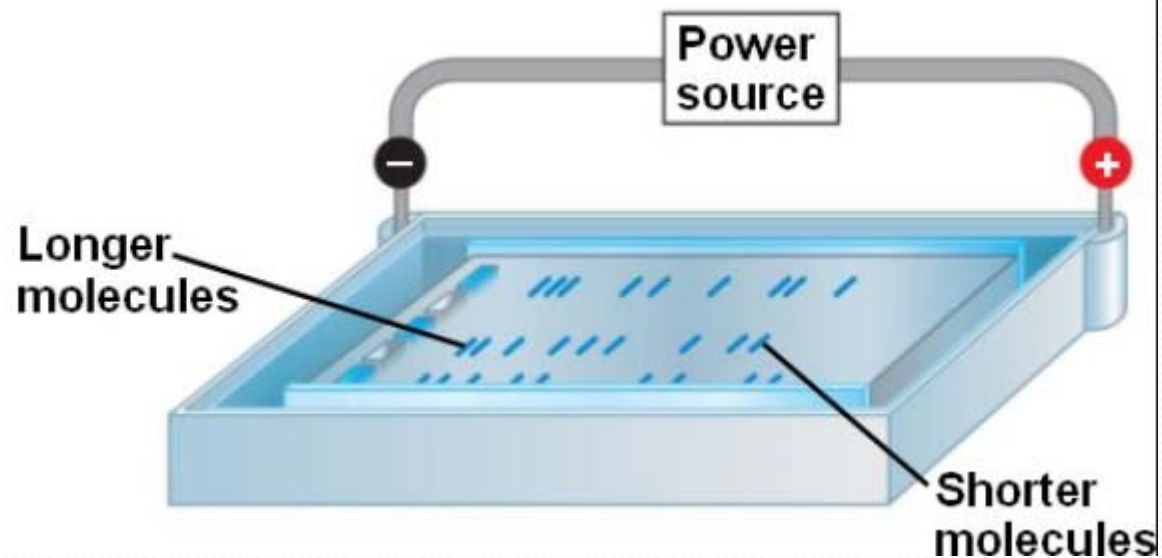


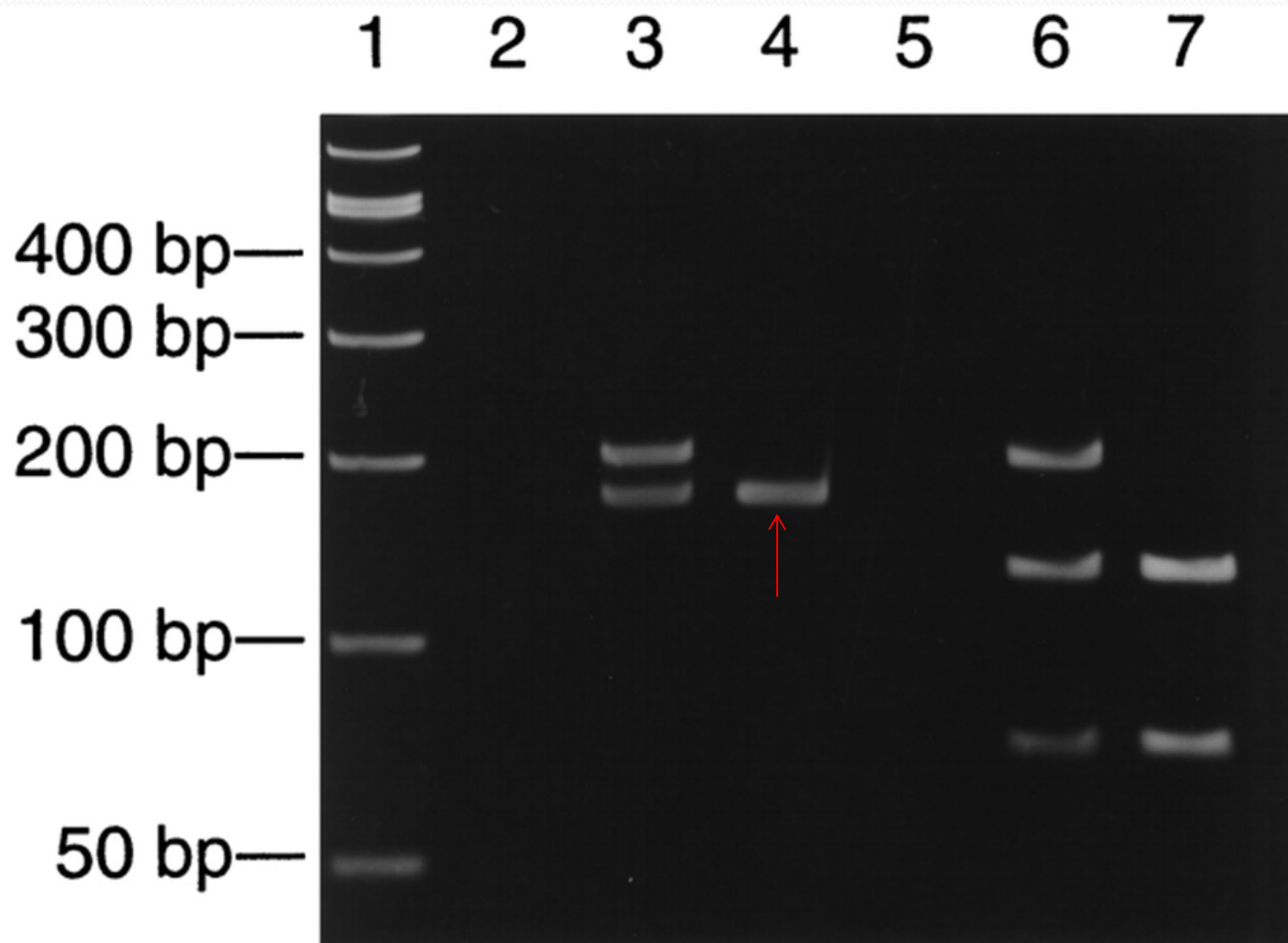
Mixture of
DNA mol-
ecules of
different
sizes

1



2





Real-time PCR

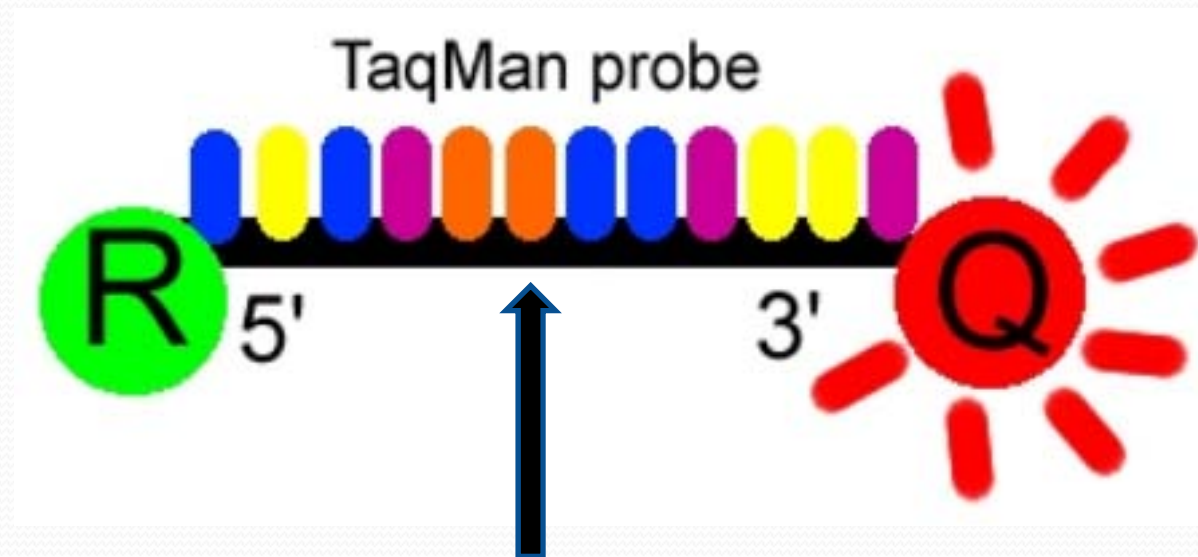
specific

sensitive

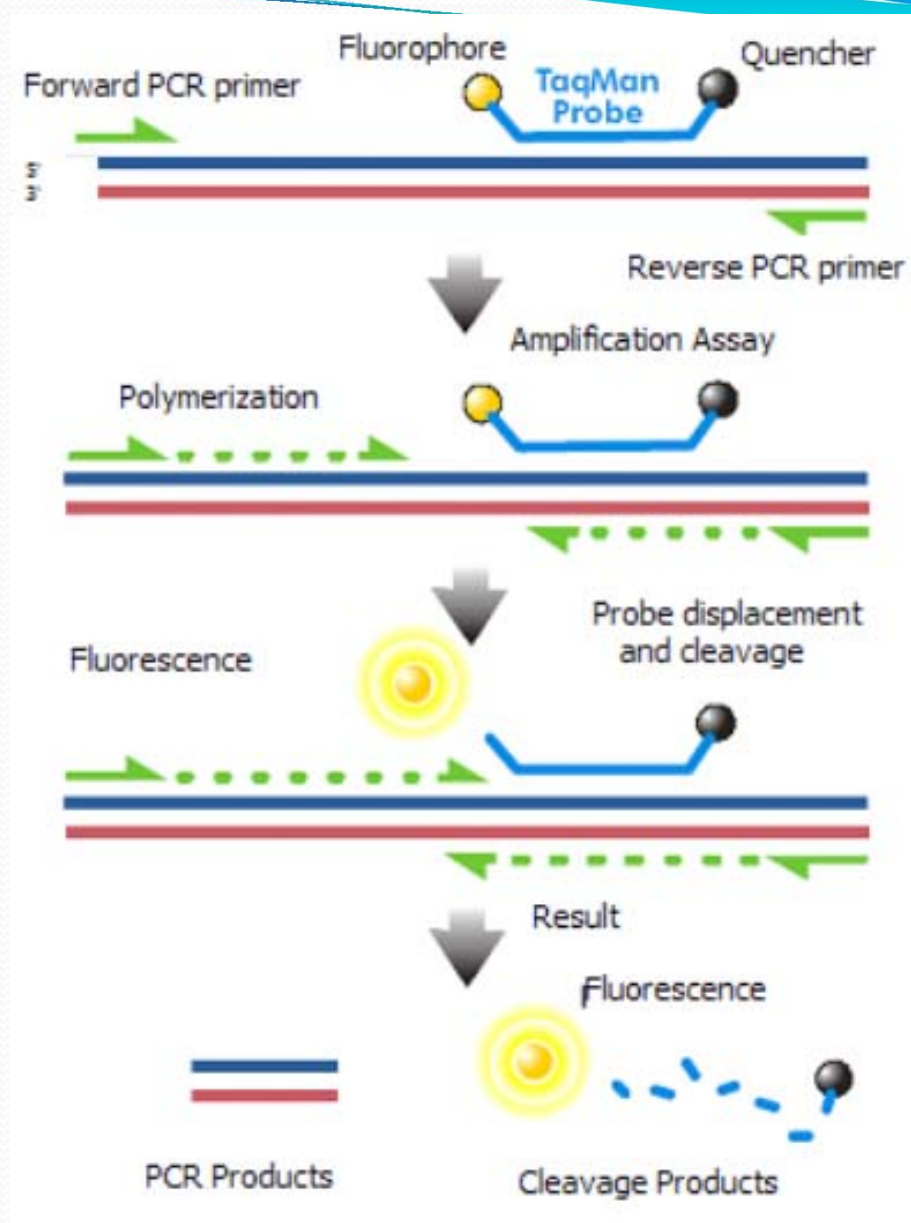
rapid

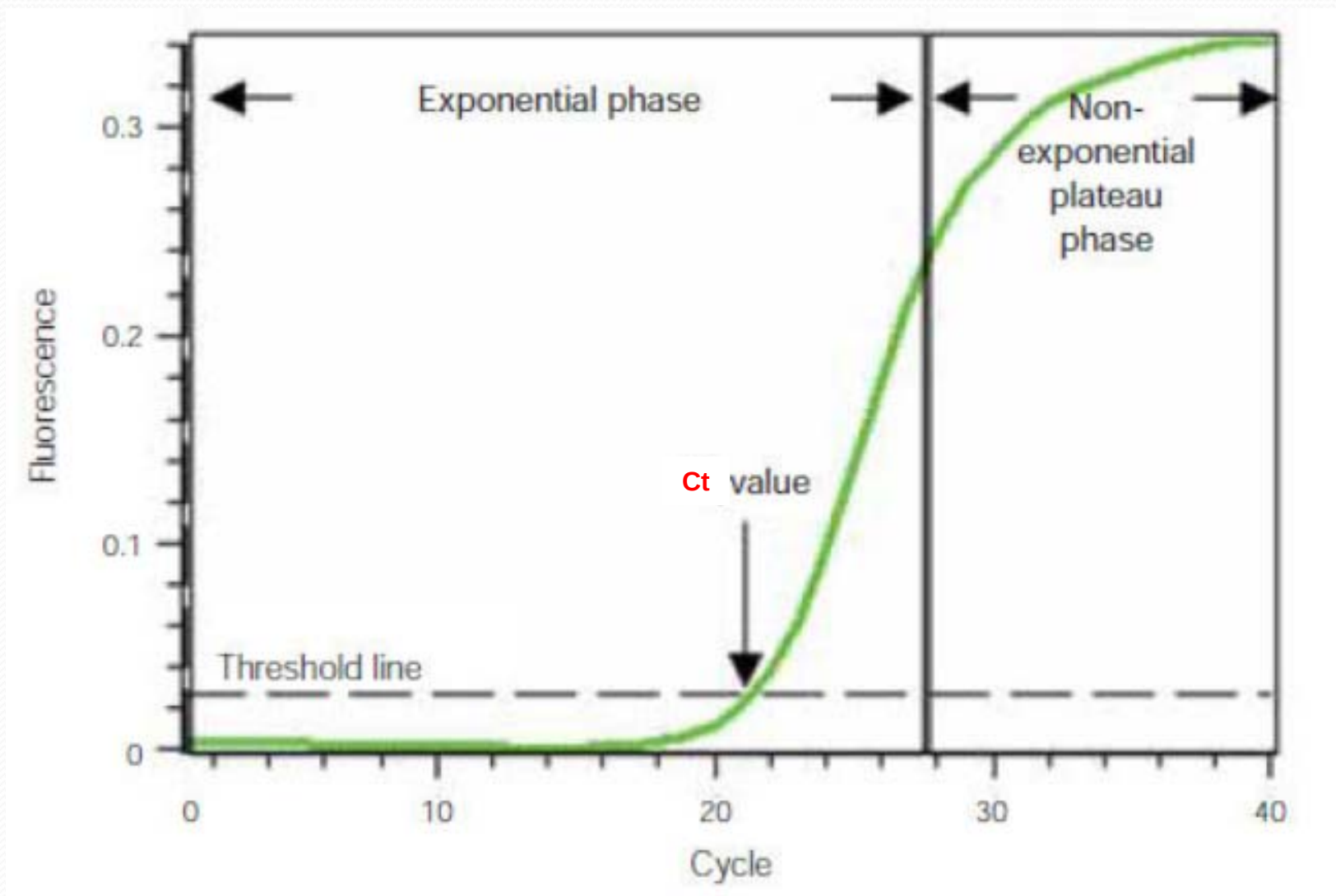
quantification

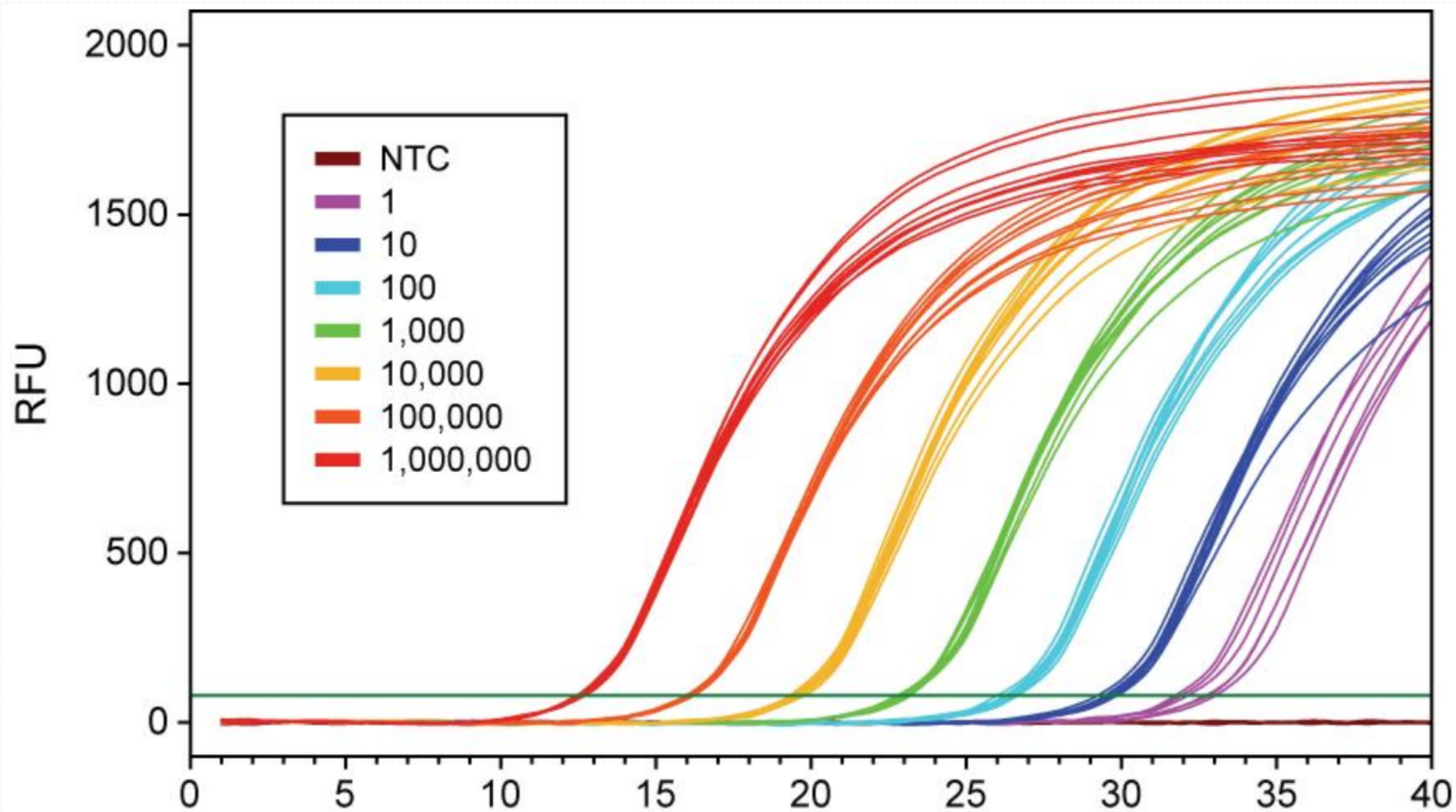
Probe for real-time PCR



specific nucleotide sequence







引子及探針序列

Gene	Primer (5'→3')	Size	References
<i>ipaH</i>	ipaH-1345: ACCATGCTCGCAGAGAAACT	181 bp	Wen S. Lin <i>et al.</i> 2010
	ipaH-1506: TACGCTTCAGTACAGCATGC		
	ipaHP-1401:		
	FAM- TGGCGTGTCGGGAGTGACAGC –BHQ1		
<i>lacY</i>	lacY-884: CTGGCACTATTATGTCTGTA	102 bp	Melanie Pavlovic <i>et al.</i> 2011 This study
	lacY-985: GGAACGGTACTTCAAACA		
	lacY-P:		
	FAM-CTCATCGTTTCGCCACCTCAGC-BHQ1		

	<i>Shigella</i> spp.	EIEC
<i>ipaH</i>	+	+
<i>lacY</i>	-	+

EIEC: Enteroinvasive *Escherichia coli*



回首頁 \ 網站導覽 \ 行動版 \ English \ 兒童園地 \ 雙語辭彙 \ 常見問答 \ 為民服務信箱 \ 衛生局專區

f 食用玩

f 睡睡平安

f 化粧品安全



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



字級大小:



請輸入關鍵字

☐ 站內

☒ 站外

熱門關鍵字：營養標示 食品添加物 非登不可 基因改造 食藥關謠有 防腐劑 塑化劑 健康食品 重金屬 茶 營養標示 食

公告資訊

機關介紹

業務專區

法規資訊

便民服務

出版品

個人化服務

...

業務專區

食品

藥品

醫療器材

化粧品

管制藥品

實驗室認證

區管理中心

研究檢驗

邊境查驗專區

製藥工廠管理

通報及安全監視專區

当前位置：首頁 > 公告檢驗方法 > 研究檢驗 > 公告檢驗方法

公告檢驗方法

分類：

區域檢索：

序號	標題	發布日期
1	食品微生物之檢驗方法－金黃色葡萄球菌之檢驗(MOHWM0002.02)	2015-10-13
2	食品微生物之檢驗方法－曲狀桿菌之檢驗(MOHWM0007.02)	2015-10-02
3	食品微生物之檢驗方法－志賀氏桿菌之檢驗(MOHWM0003.02)	2015-04-29
4	食品微生物之檢驗方法－阪崎腸桿菌之檢驗	2015-01-07
5	食品微生物之檢驗方法－病原性大腸桿菌之檢驗	2014-12-10
6	食品中微生物之檢驗方法－星狀病毒之檢驗(自103年10月1日生效)	2014-06-27
7	食品中微生物之檢驗方法－諾羅病毒之檢驗(自103年10月1日生效)	2014-06-27
8	食品中微生物之檢驗方法－A型肝炎病毒之檢驗(自103年9月1日生效) 	2014-06-16
9	食品微生物之檢驗方法－單核球增多性李斯特菌之檢驗	2014-01-09
10	食品微生物之檢驗方法－沙門氏桿菌之檢驗	2013-12-23

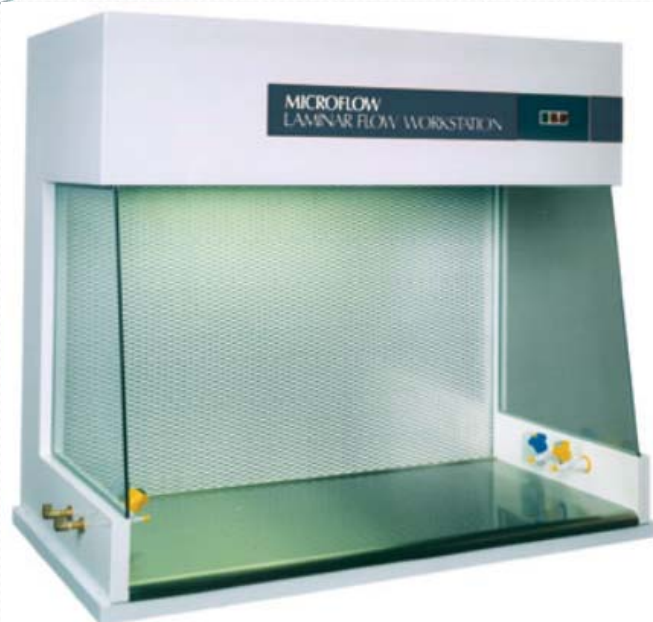


97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

第二部：志賀氏桿菌之 real-time PCR 檢測

1. 適用範圍：本方法適用於志賀氏桿菌之鑑別。
2. 檢驗方法：檢體之增菌液或經分離純化後之菌株，經 DNA 萃取後，以即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 進行鑑別之方法。
 - 2.1. 工作環境：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、檢體 DNA 抽取、real-time PCR 試劑配製及 real-time PCR 等檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。Real-time PCR 試劑之配製應於生物安全操作櫃內進行。

操作場地要多乾淨？



- ◆ 找一個僻靜的所在
- ◆ 桌面先用酒精擦過



2.2. 裝置^(註 1)

2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System，或同級品。

2.2.2. 高壓滅菌釜。

2.2.3. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。

2.2.4. 加熱振盪器：具溫控及振盪功能。

2.2.5. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 $20000 \times g$ ，並具 4°C 溫控功能。

2.2.6. 離心機：供各式微量離心管離心用。

2.2.7. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。

2.2.8. 冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C)功能。

2.2.9. 旋渦混合器(Vortex mixer)。

2.2.10. 酸鹼度測定儀(pH meter)。

2.2.11. 天平：最大稱重量為 2000 g，靈敏度為 0.1 g；最大稱重量為 100 g，靈敏度為 1 mg。

註 1：本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或未提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。

品牌迷思??



2.3. 試藥

2.3.1. DNA 抽取用：適用於革蘭氏陰性細菌 DNA 抽取之市售套組。

2.3.2. Real-time PCR 用^(註2)

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針

2.3.2.1.1. 侵入質體抗原基因(標的基因：*ipaH*)

引子 F：5'-ACCATGCTCGCAGAGAAACT-3'

引子 R：5'-TACGCTTCAGTACAGCATGC-3'

探針 P：

5'-(FAM)-TGGCGTGTCGGGAGTGACAGC-(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 181 bp

2.3.2.1.2. 乳糖通透酶基因(標的基因：*lacY*)

引子 F：5'-CTGGCACTATTATGTCTGTA-3'

引子 R：5'-GGAACGGTACTTCAAACA-3'

探針 P：

5'-(FAM)-CTCATCGTTTCGCCACCTCAGC -(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 102 bp

註2：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，探針5'端採用 6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用 Black Hole Quencher-1 (BHQ1)標記。

2.4. 器具及材料^(註 3)

2.4.1. 微量吸管(Micropipette)：2 μ L、10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。

2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tip)：可滅菌。10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。

2.4.3. 離心管：200 μ L、600 μ L、1.5 mL 及 2 mL。

2.4.4. Real-time PCR 反應管：100 μ L。

2.4.5. Real-time PCR反應盤：具 96 個反應孔，適用於 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System。

2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。

註 3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。



2.5. Real-time PCR 溶液^(註 4)

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

10 μ M 引子 F..... 0.5 μ L

10 μ M 引子 R..... 0.5 μ L

10 μ M 探針..... 0.5 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..... 6.0 μ L

總體積..... 25.0 μ L

註 4：Real-time PCR 溶液應置於冰浴中配製。

2.6. 檢體 DNA 溶液之製備

2.6.1. 檢體增菌液之 DNA 溶液製備

自第一部 2.3.1.節於 35°C 培養 18~24 小時之檢液中吸取菌液 1 mL，置入已滅菌之 1.5 mL 離心管中，以 15000 × g 離心 3 分鐘，去除上清液。

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，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。

2.6.2. 分離菌株之 DNA 溶液製備

自培養基上鈎取一接種環的菌量，置入含有無菌去離子水 1 mL 之已滅菌 1.5 mL 離心管中，振盪混合均勻，煮沸 10 分鐘，取出離心管，待冷卻後以 15000 × g 離心 3 分鐘，吸取上清液至另一已滅菌 1.5 mL 離心管，作為檢體 DNA 原液，置於-20°C 冷凍保存。亦可依 2.6.1.2.節進行檢體 DNA 原液之製備。

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。

2.7. 鑑別試驗^(註 5)

2.7.1. Real-time PCR 操作步驟

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取已滅菌之 1.5 mL 離心管，依照 2.5.節配製 real-time PCR 溶液，依序加入 TaqMan® Fast Reagents Starter Kit、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 20 μ L 入 real-time PCR 反應盤的反應孔中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，再將 real-time PCR 反應盤置於離心機中，以 200 $\times$ g 瞬間離心，移入 real-time PCR 反應器，依下列條件進行反應。同時另製作正反應及負反應對照組，於侵入質體抗原基因反應以志賀氏桿菌或 EIEC 為正反應對照組，乳糖通透酶反應以 EIEC 為正反應對照組。

2.7.1.1. 侵入質體抗原基因及乳糖通透酶基因反應條件

步驟	溫度	時間
1. 熱活化	95°C	20 sec
2. 最初變性	95°C	3 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。		

2.7.2. Real-time PCR 螢光分析

檢體 DNA 經 real-time PCR 反應後，直接從 real-time PCR 反應器上之螢幕觀察探針所產生之螢光增幅曲線，即可判讀反應結果。同時另測試正反應及負反應對照組。

2.7.3. 確認

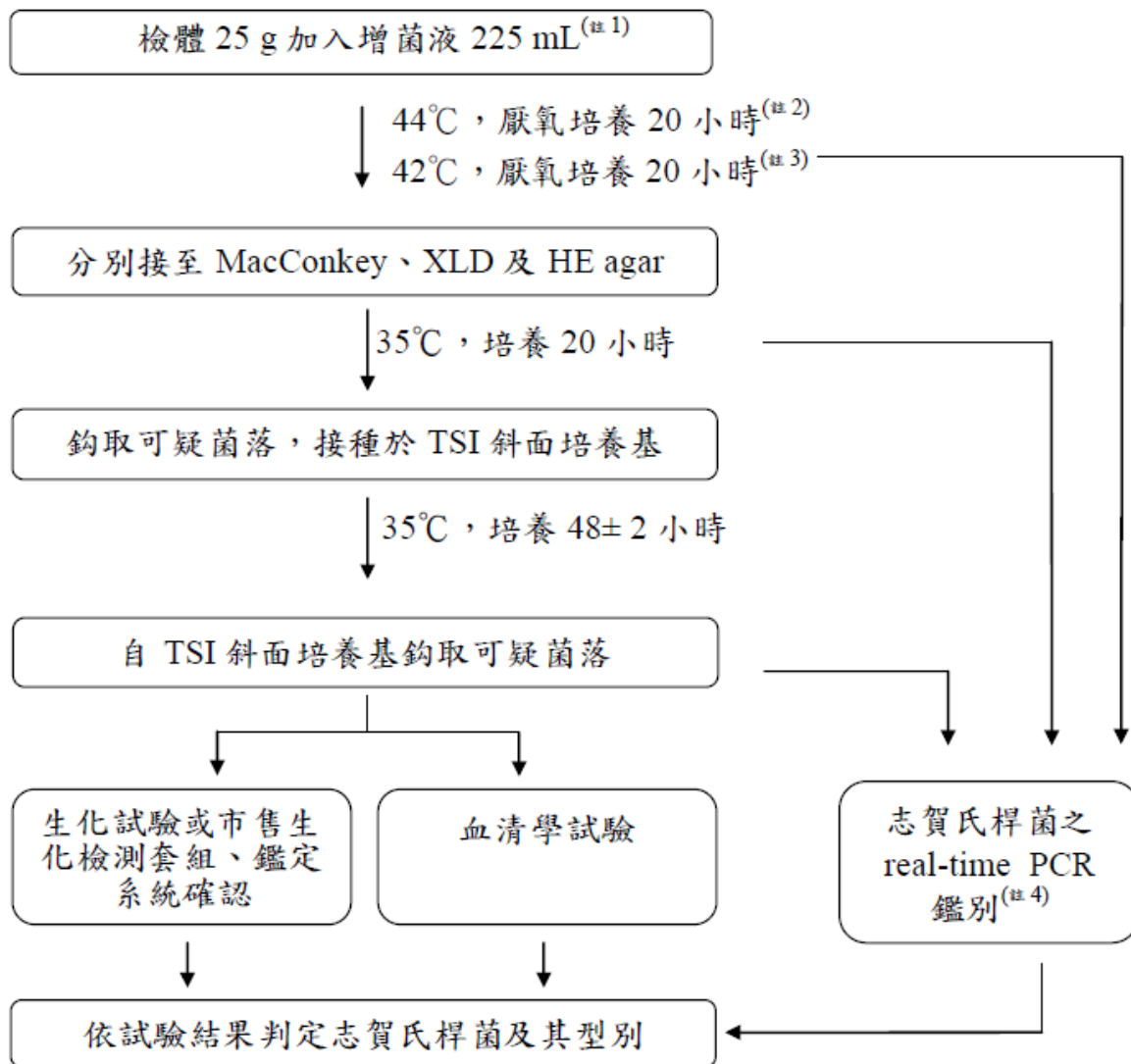
檢體 DNA 之 real-time PCR 增幅產物螢光分析圖與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體 DNA 與標的基因之正反應對照組之 real-time PCR 螢光分析圖均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 real-time PCR 增幅產物為標的基因片段。志賀氏桿菌侵入質體抗原基因為正反應，乳糖通透酶基因為負反應。EIEC 之前述兩者基因皆為正反應。

註5：本Real-time PCR反應條件係採Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

附註：第二部志賀氏桿菌之 real-time PCR 檢驗可視需要執行。

Real-time PCR使用時機??

檢驗流程圖



- 當長官很急時
- 當生化反應結果令人困惑時
- 當有必要分析其致病性時
- 面對未知物想亂槍打鳥時
- 當進行能力試驗時....

Trouble- shooting guide

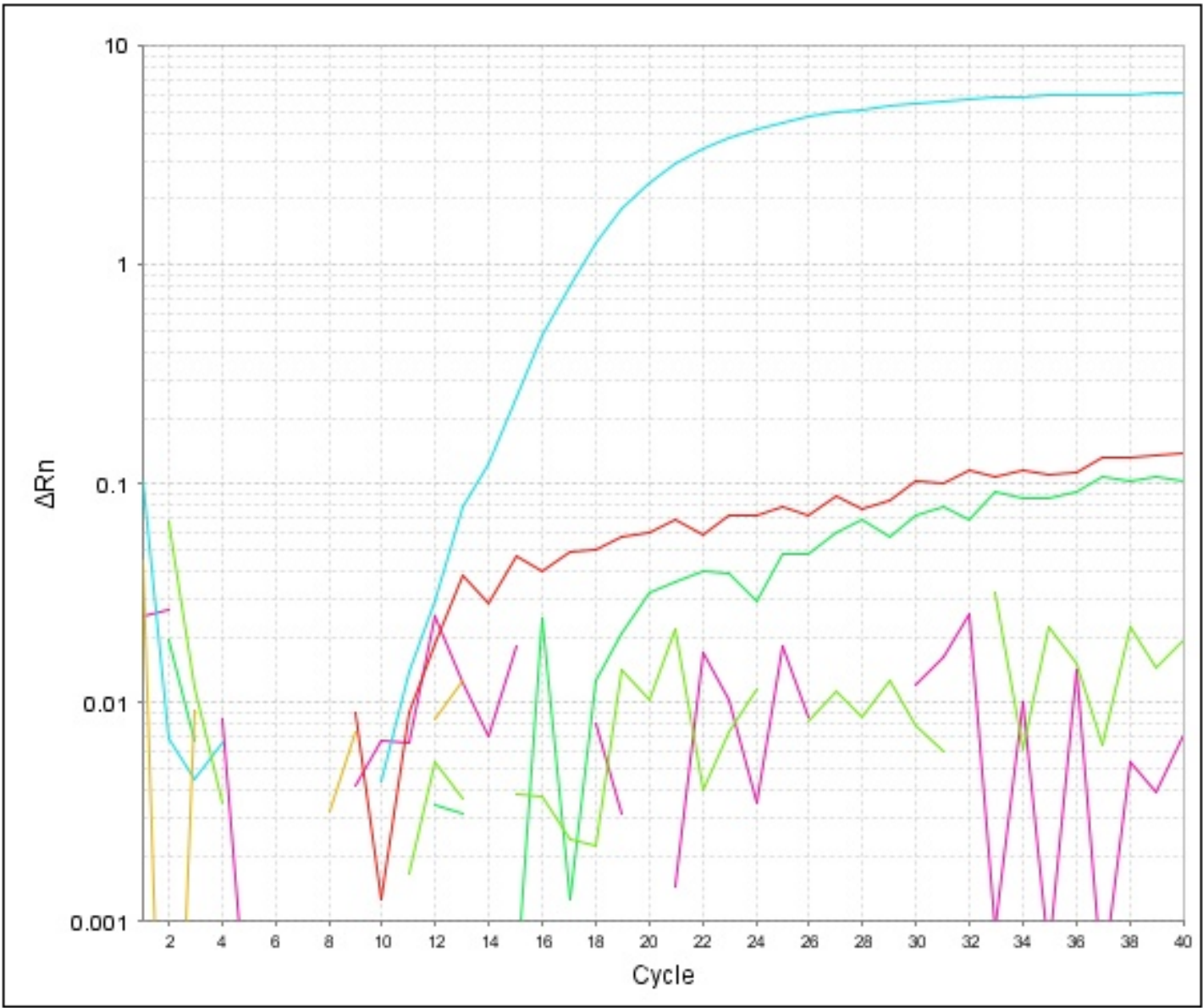


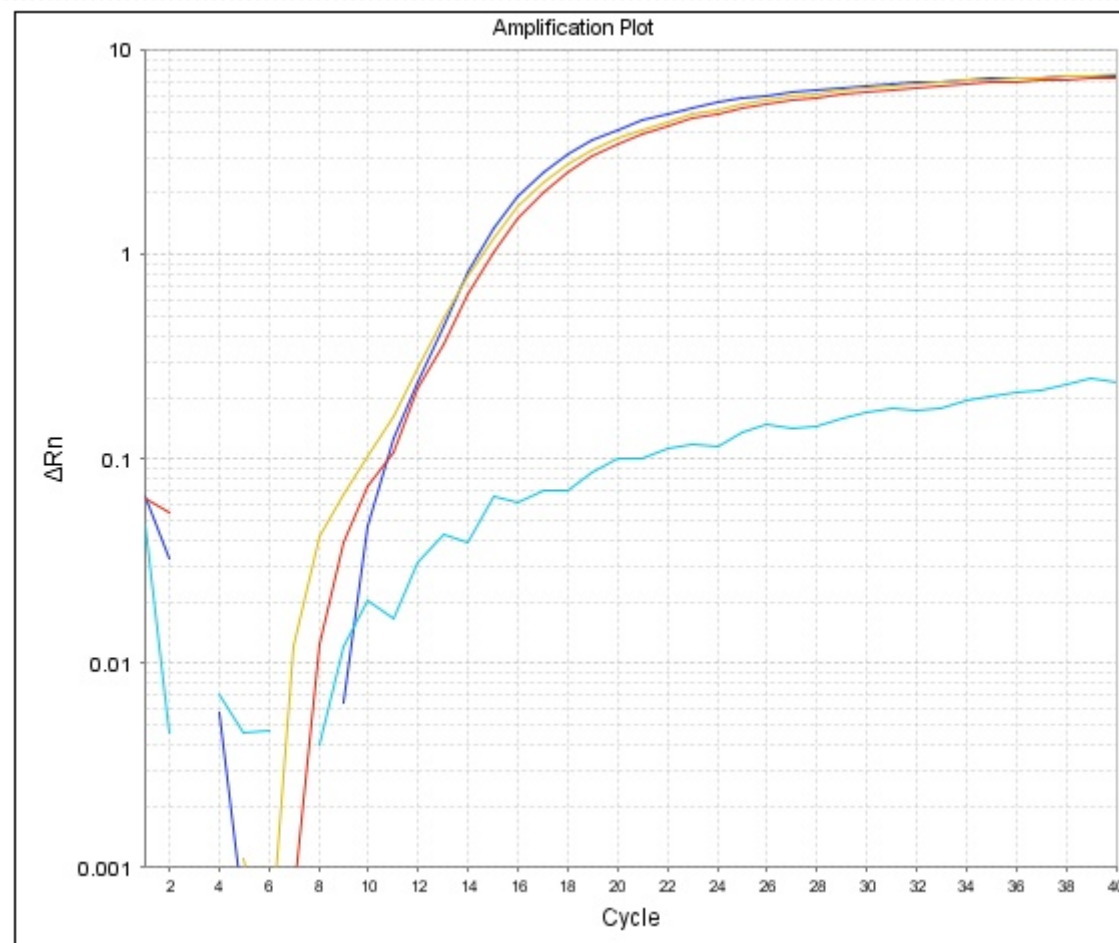
Real-time PCR能給我一切嗎？

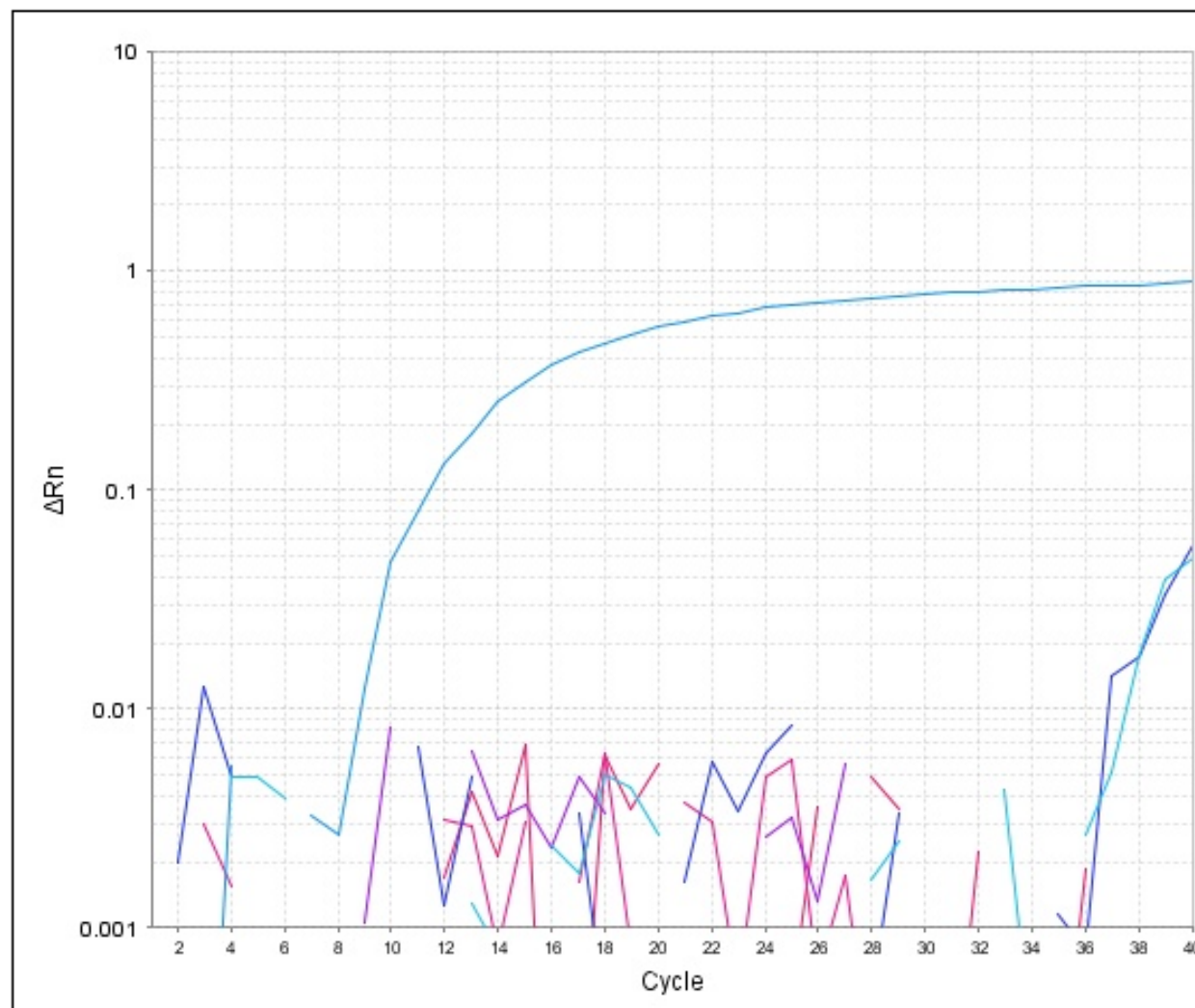
- DNA濃度太高時要稀釋
- 當DNA品質太差時要重新萃DNA
- 無法區分死活菌

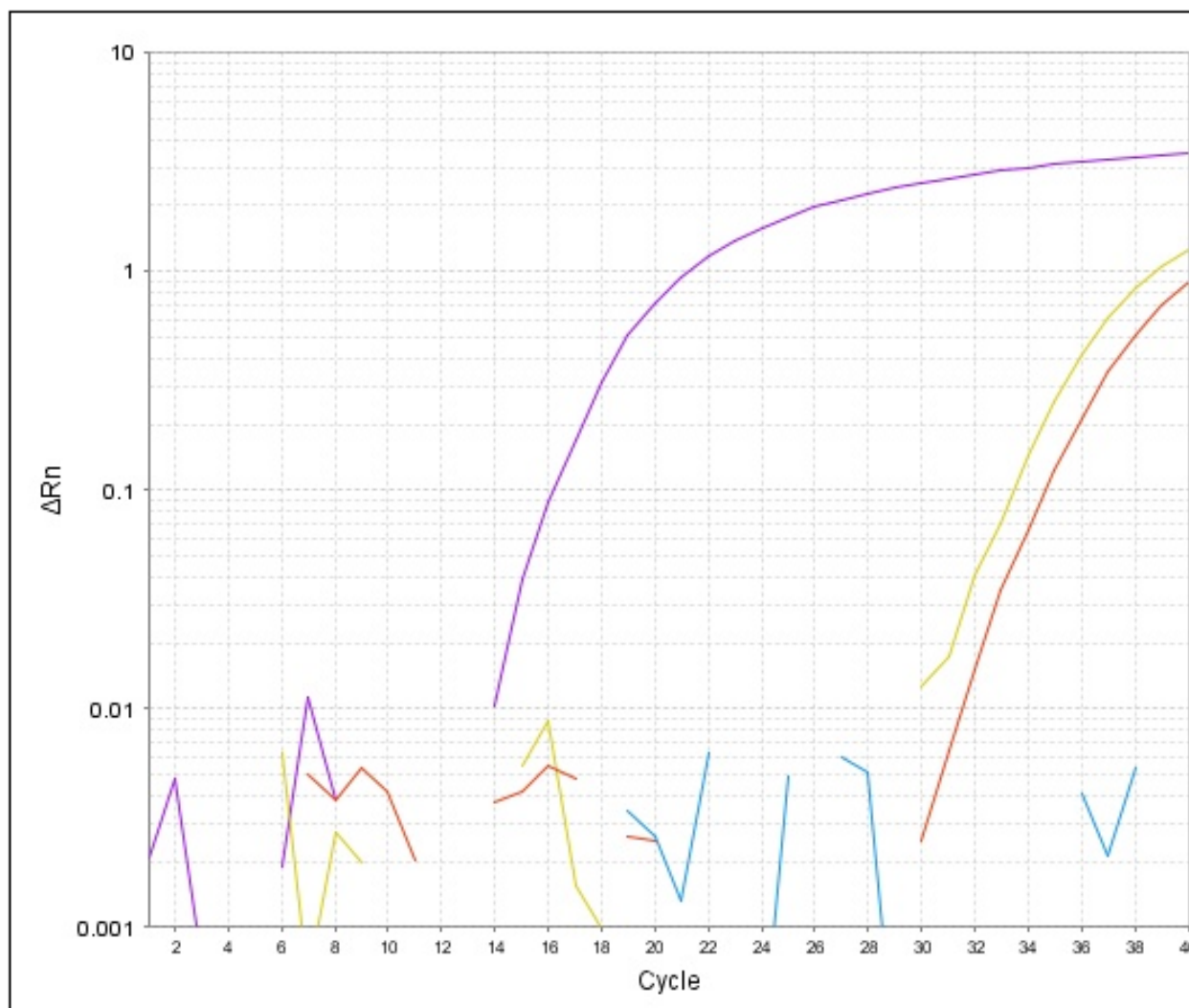
Real-time PCR結果只能當佐證，
無法作為發總結報告的唯一根據

這種圖到底算不算
positive signal??



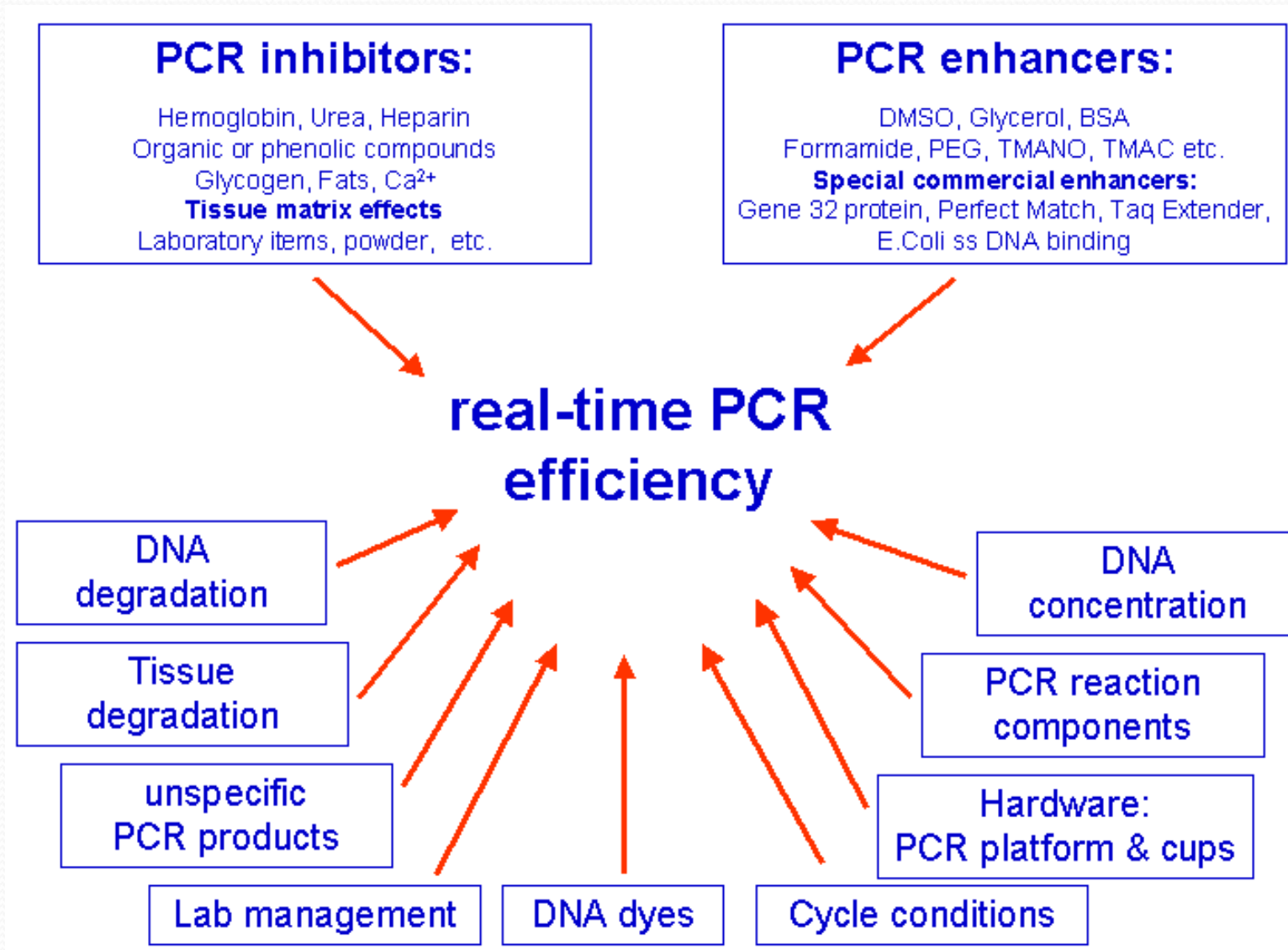






為什麼沒有訊號??

- DNA濃度太高時要稀釋
- 當DNA品質太差時要重新萃DNA
- 少加一樣東西
- 螢光波長設定選錯了
- 基因突變or primer合成錯誤
(只能說你衰^^)



Real-time PCR操作大補帖

- ◆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 for Attention ^^

實驗分組

組別(A/B)	小組成員	13:40-15:00	15:20-16:50
A組-1	陳宏銘 林毓棻 黃景義 陳安琪	傳統培養	Real-time PCR
A組-2	吳玲玲 邱碧雪 李泱 許郁雯		
B組-1	張郁琪 顏淑娥 王碧瑛 林秀英	Real-time PCR	傳統培養
B組-2	鄭瑋萱 蕭學謙 李其恩		



與現場沒有緣分的成員

~請欣賞由TFDA研檢拍攝小組主演的
「志賀氏桿菌檢驗教學影片」

拍攝手法精緻直逼金馬獎入圍水準