

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
Taiwan 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

● 阪崎腸桿菌及腸炎弧菌檢驗方法介紹

The Nobel Prize in Chemistry 1993



Kary B. Mullis

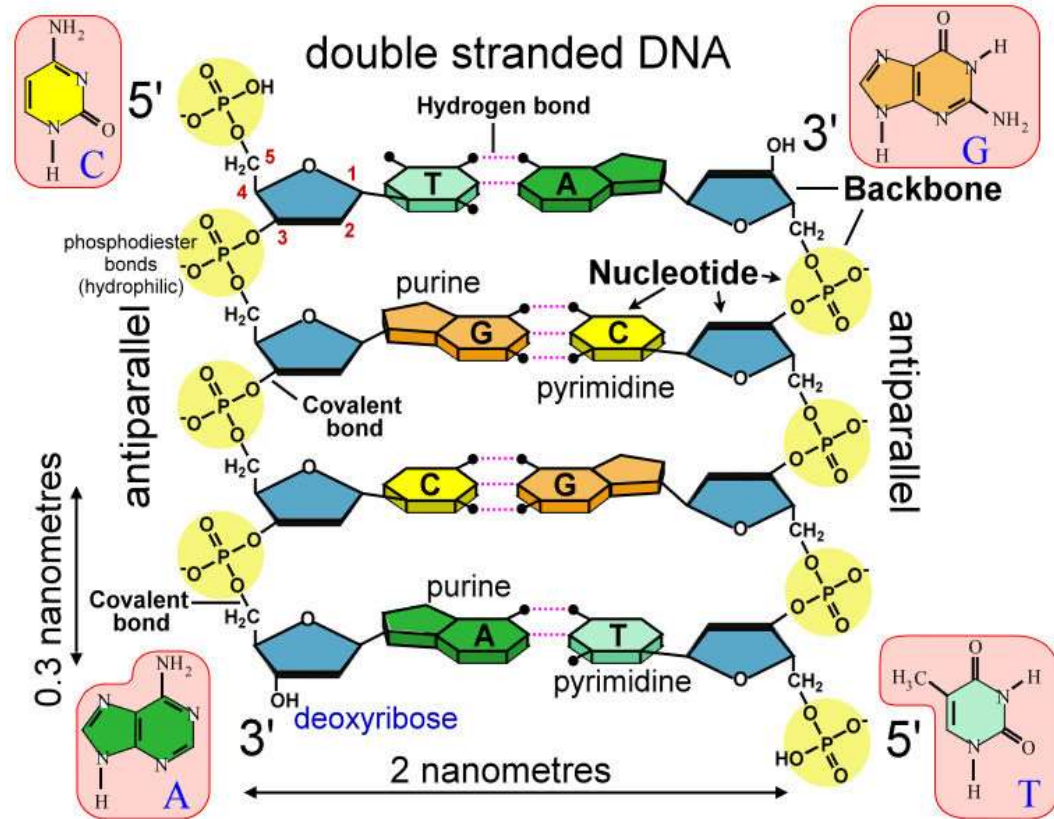
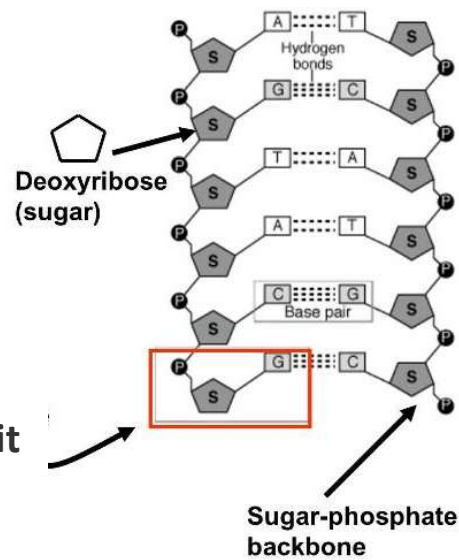
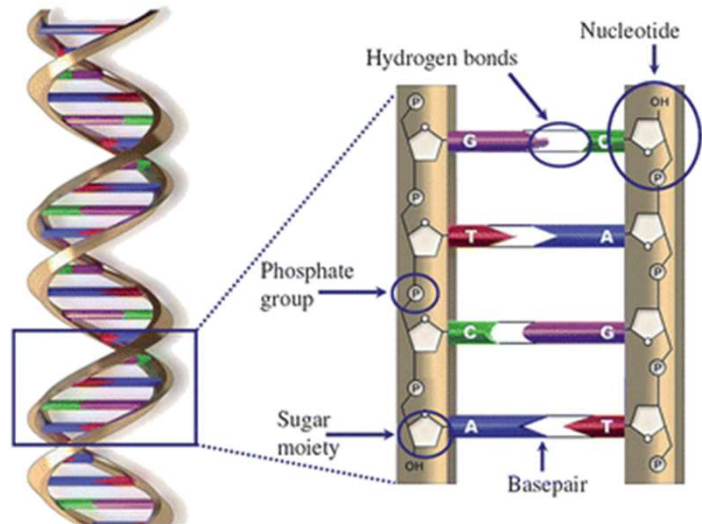
Prize share: 1/2



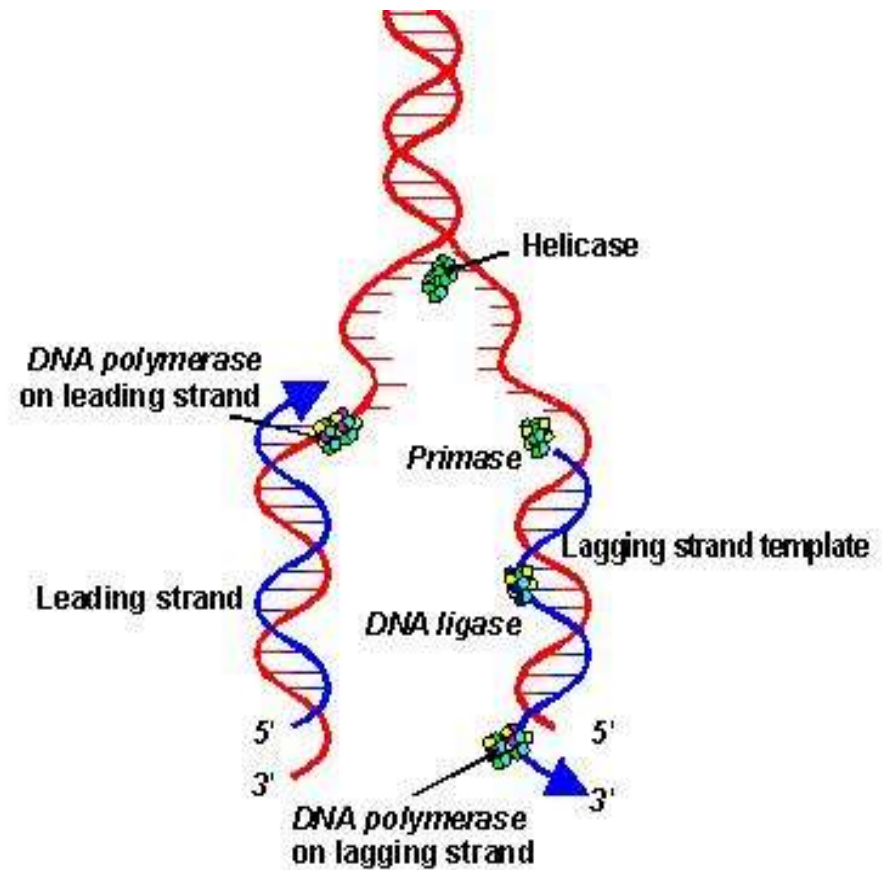
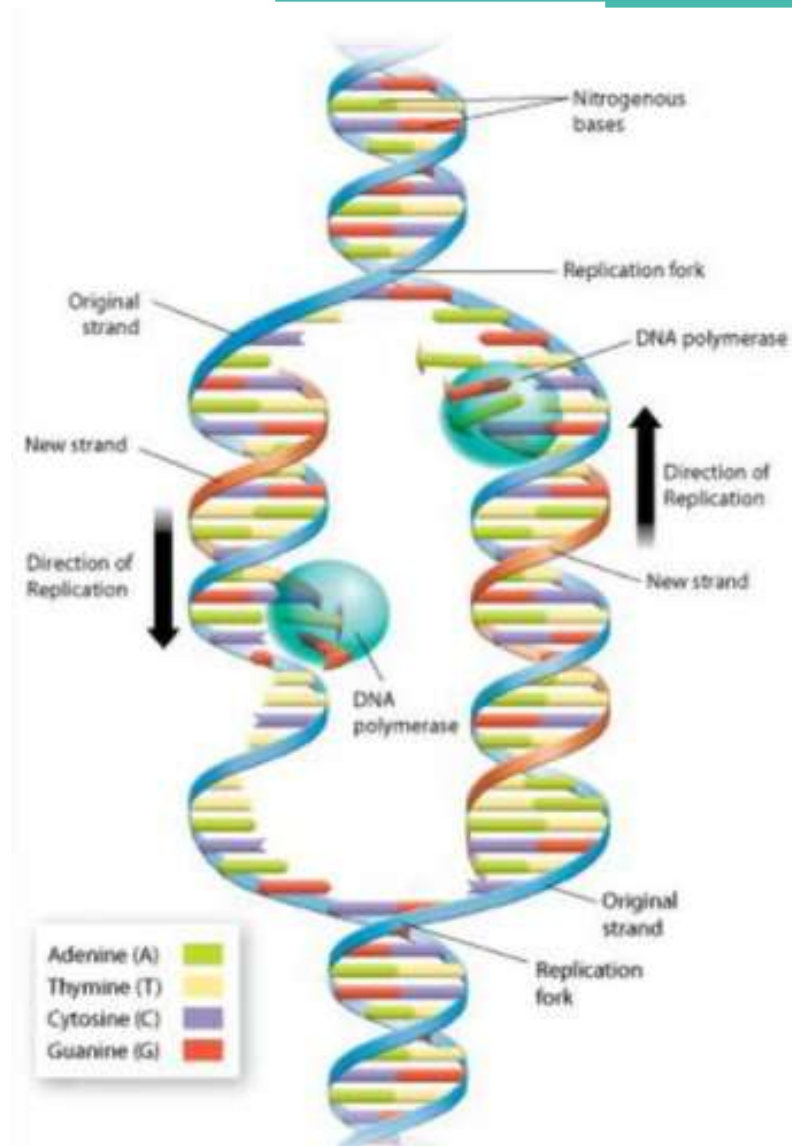
Michael Smith

Prize share: 1/2

What is DNA (deoxyribonucleic acid)

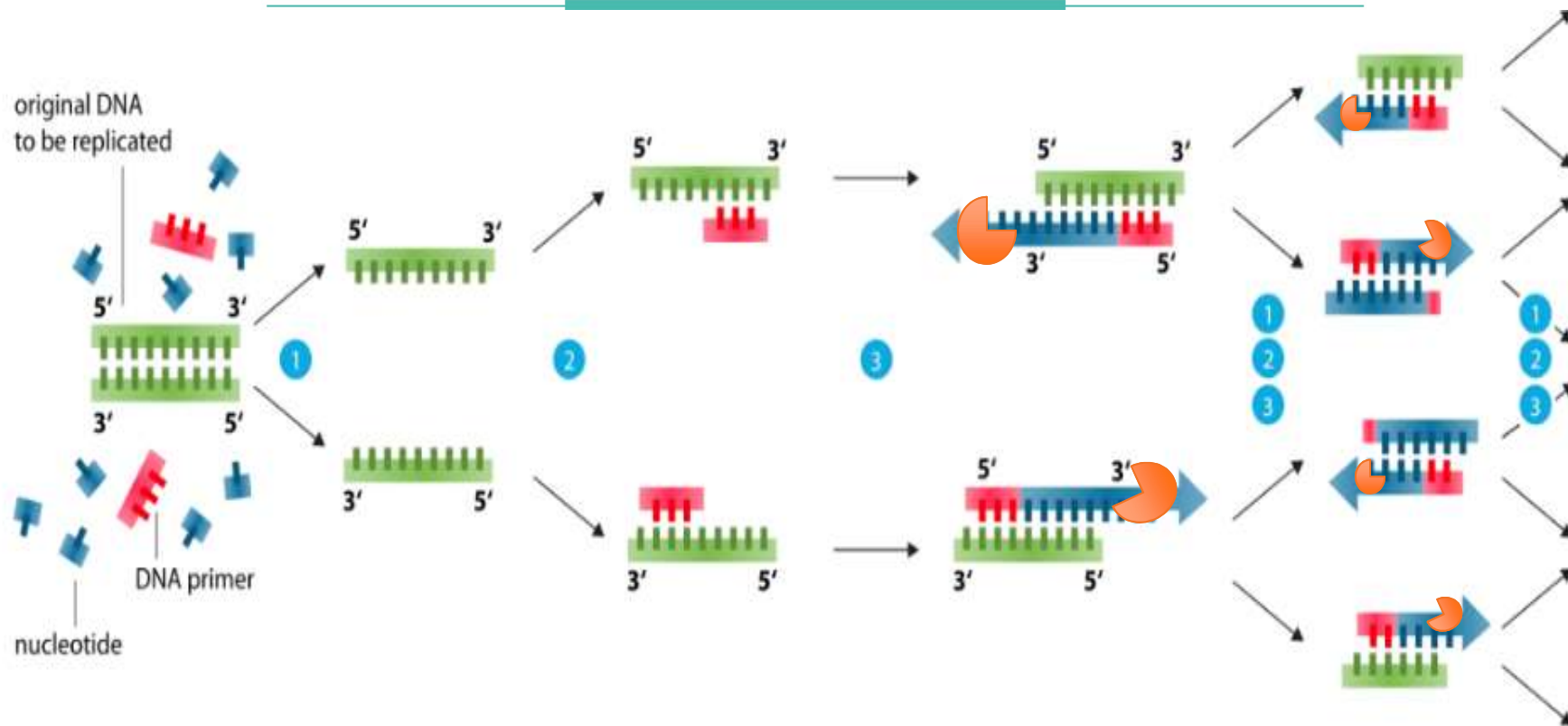


DNA replication



DNA polymerase 5' → 3'

PCR-Polymerase chain reaction

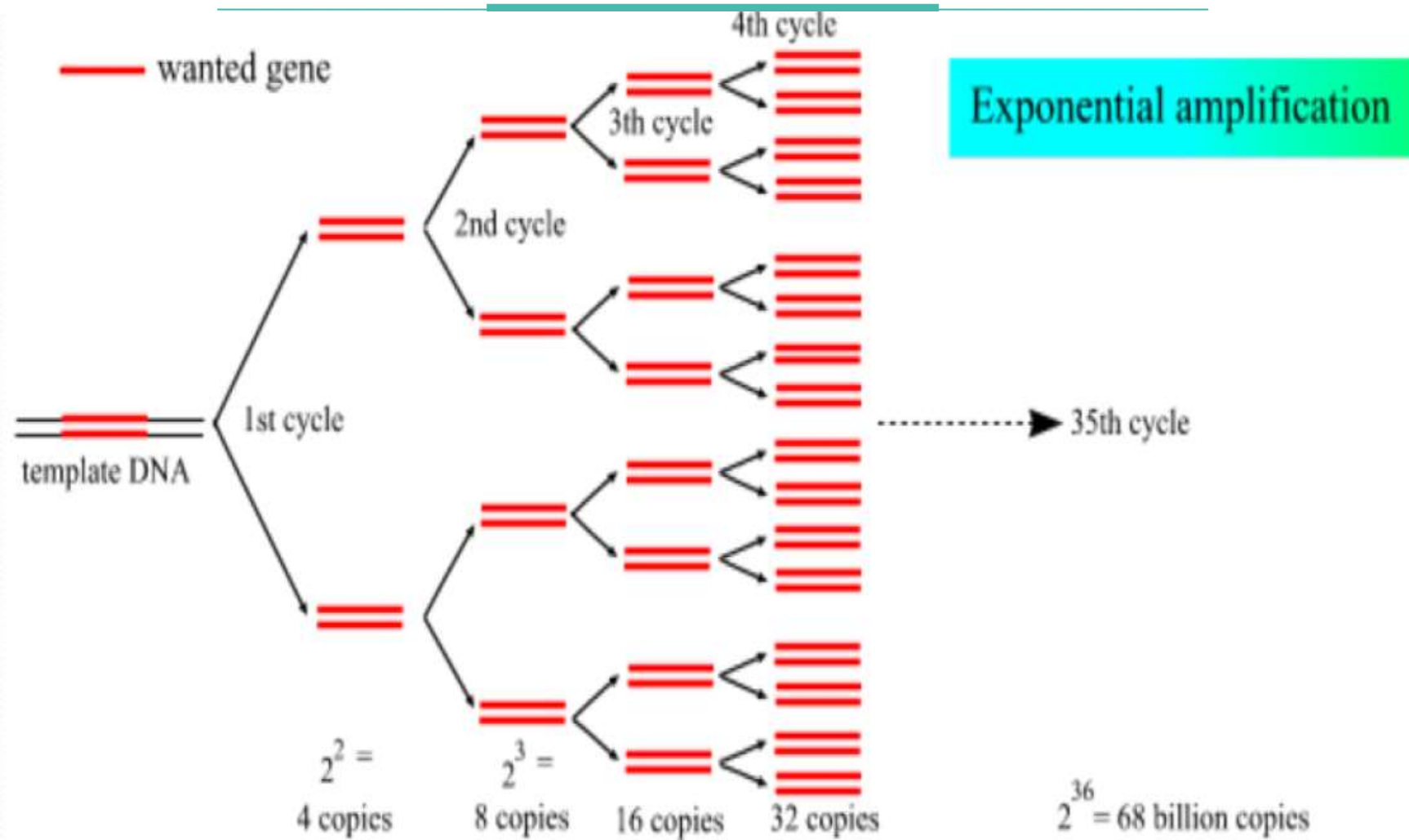


1 Denaturation at 94-96°C

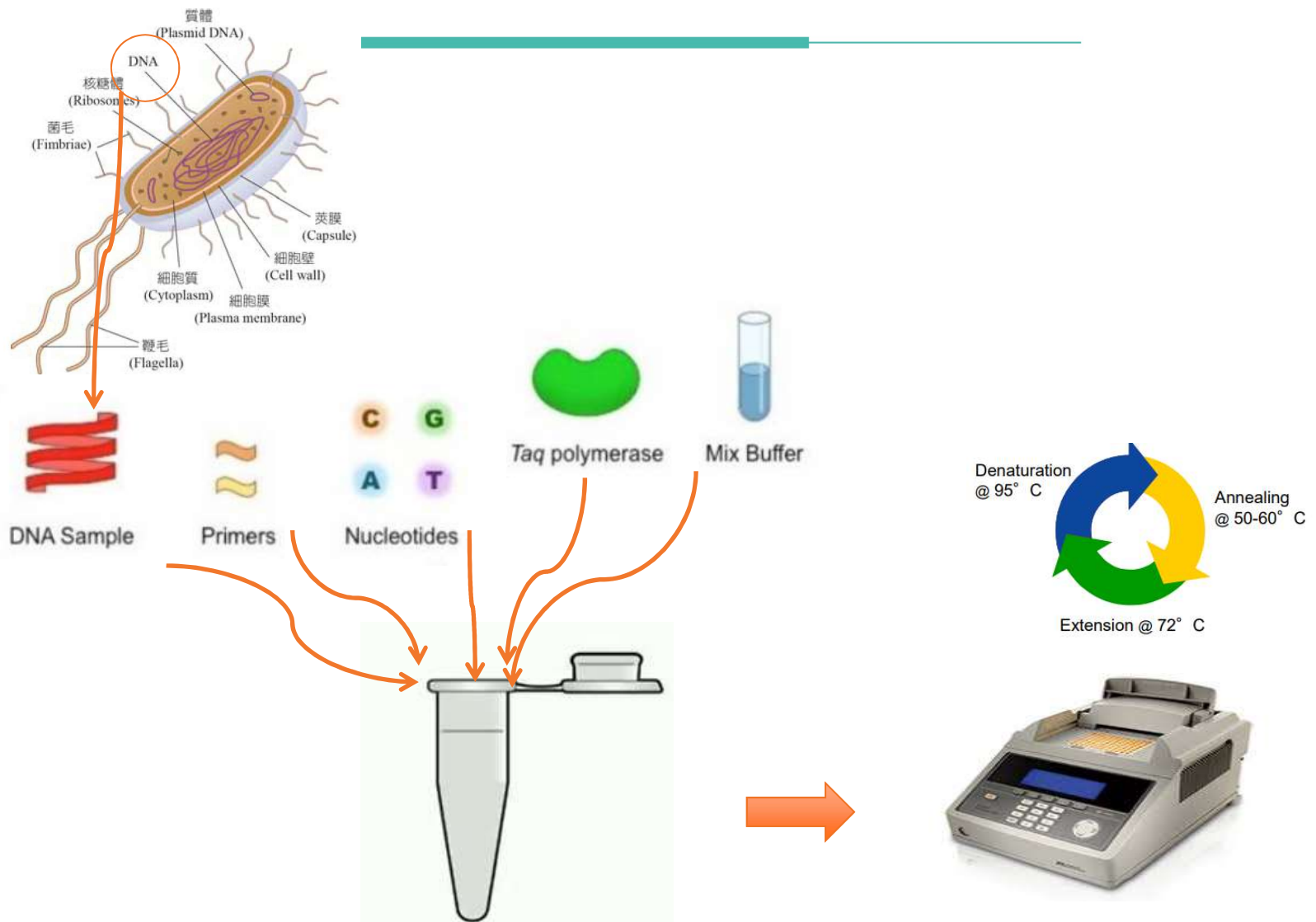
2 Annealing at ~68°C

3 Elongation at ca. 72 °C

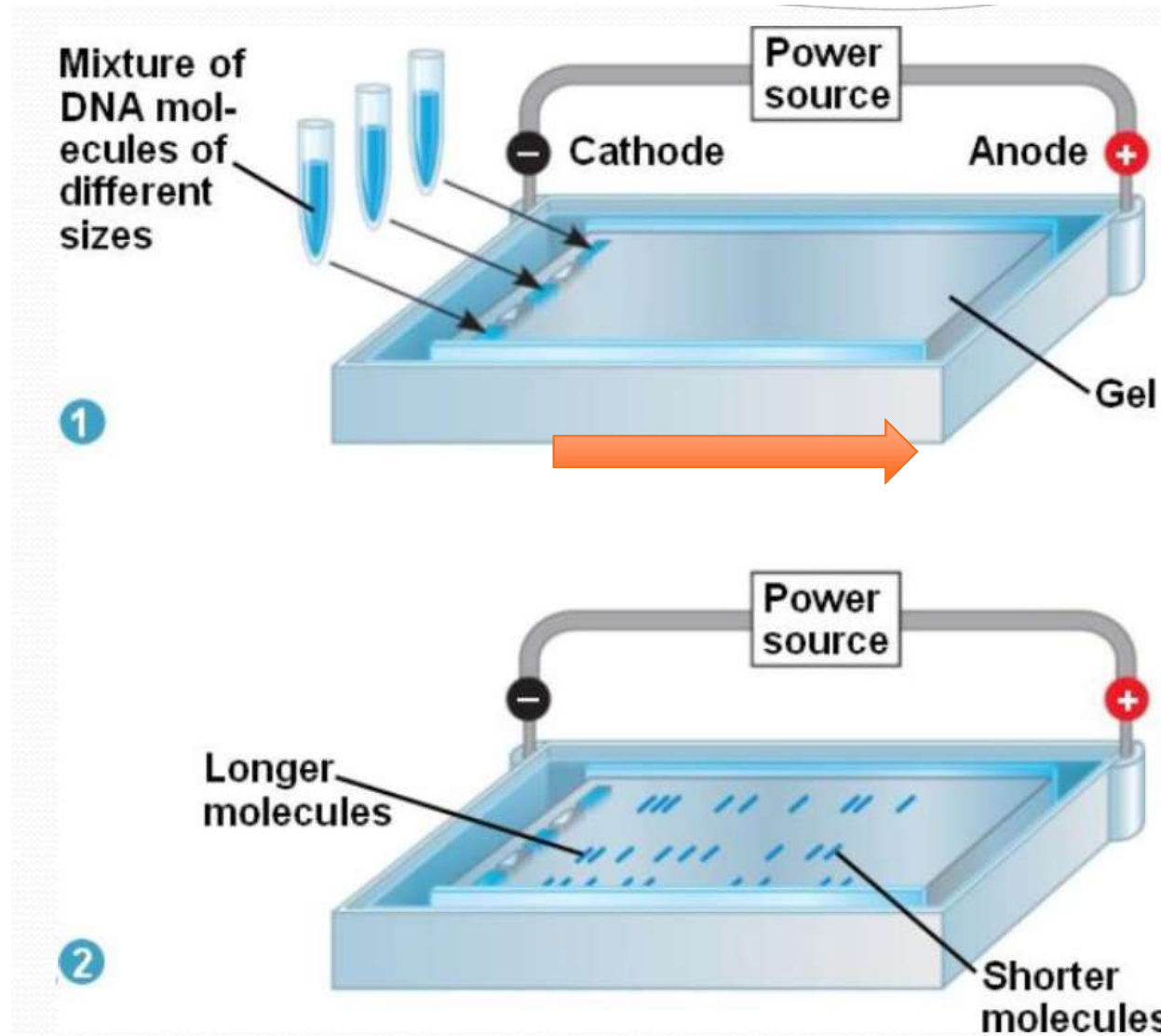
 polymerase



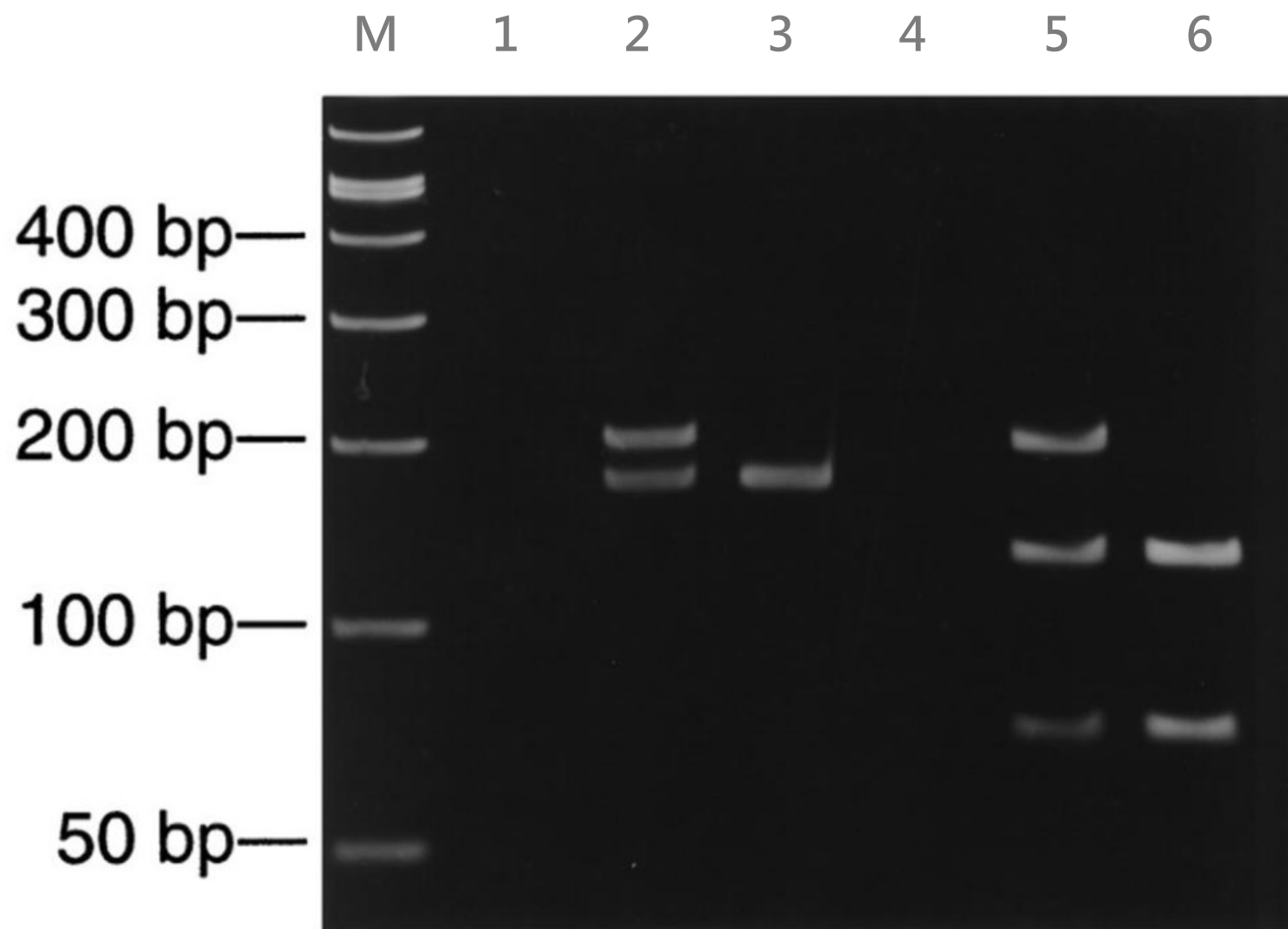
PCR



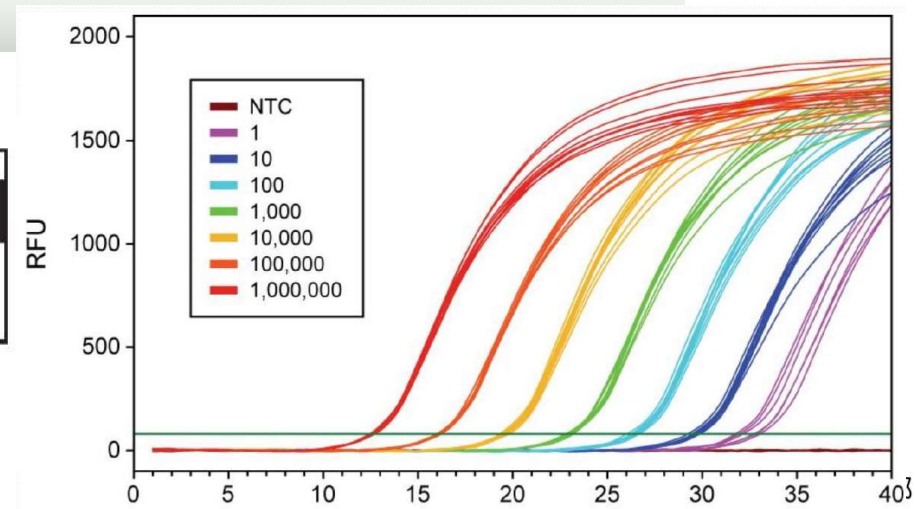
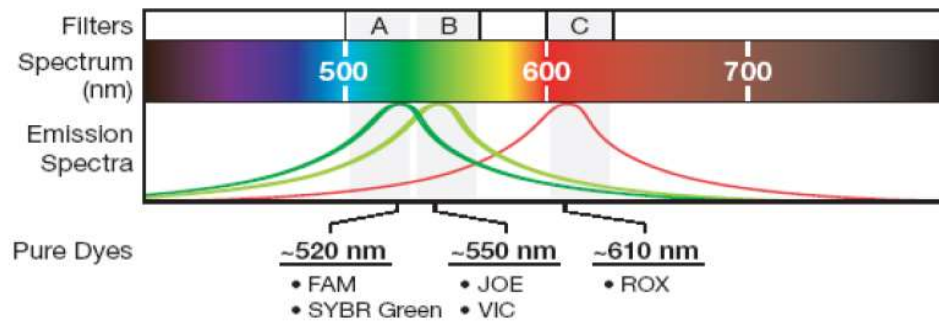
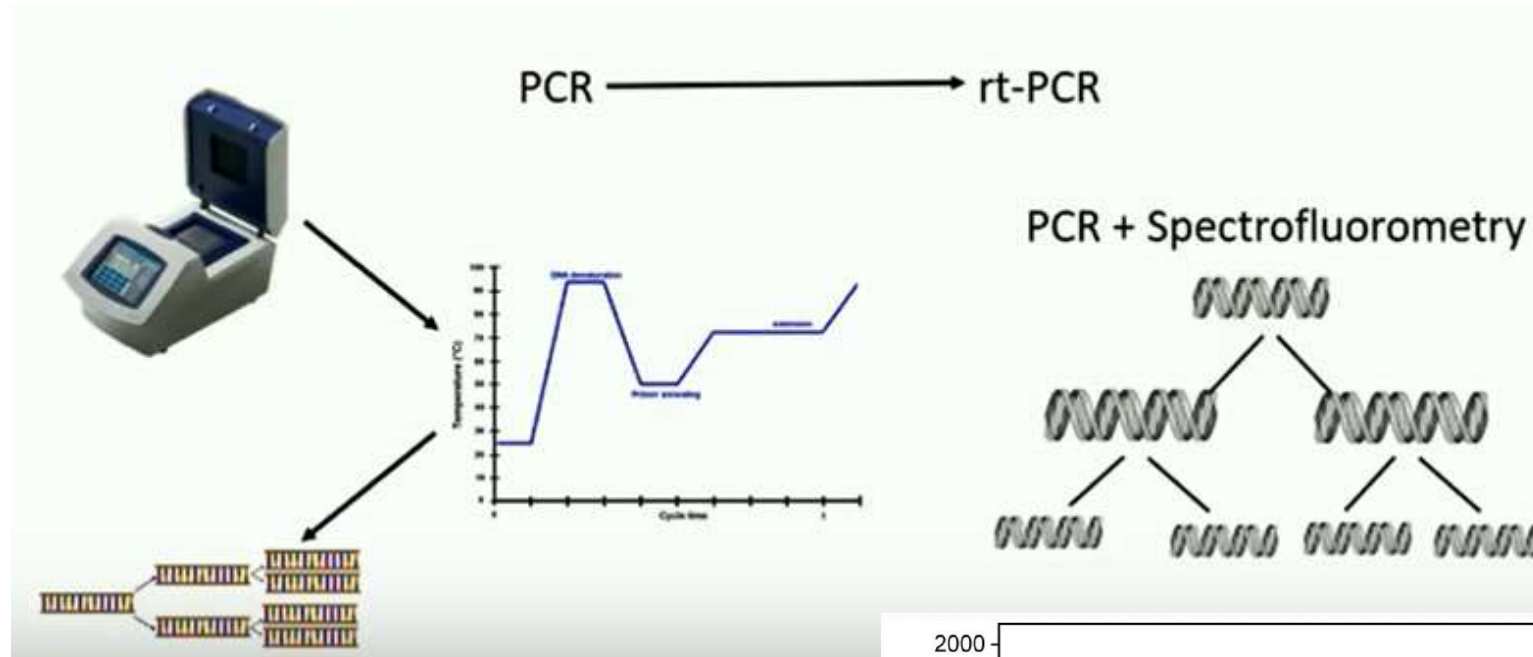
膠體電泳



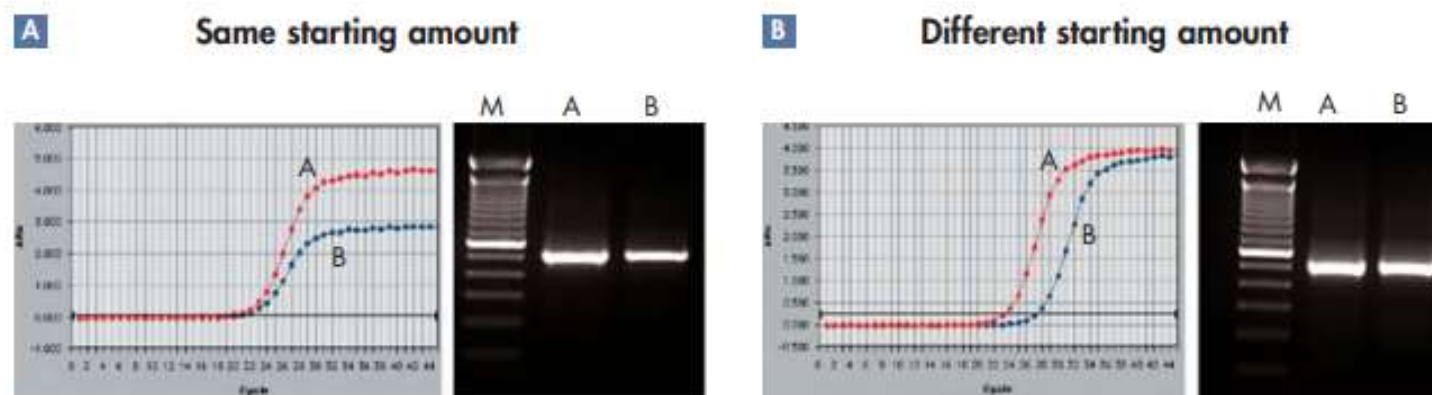
電泳膠片結果

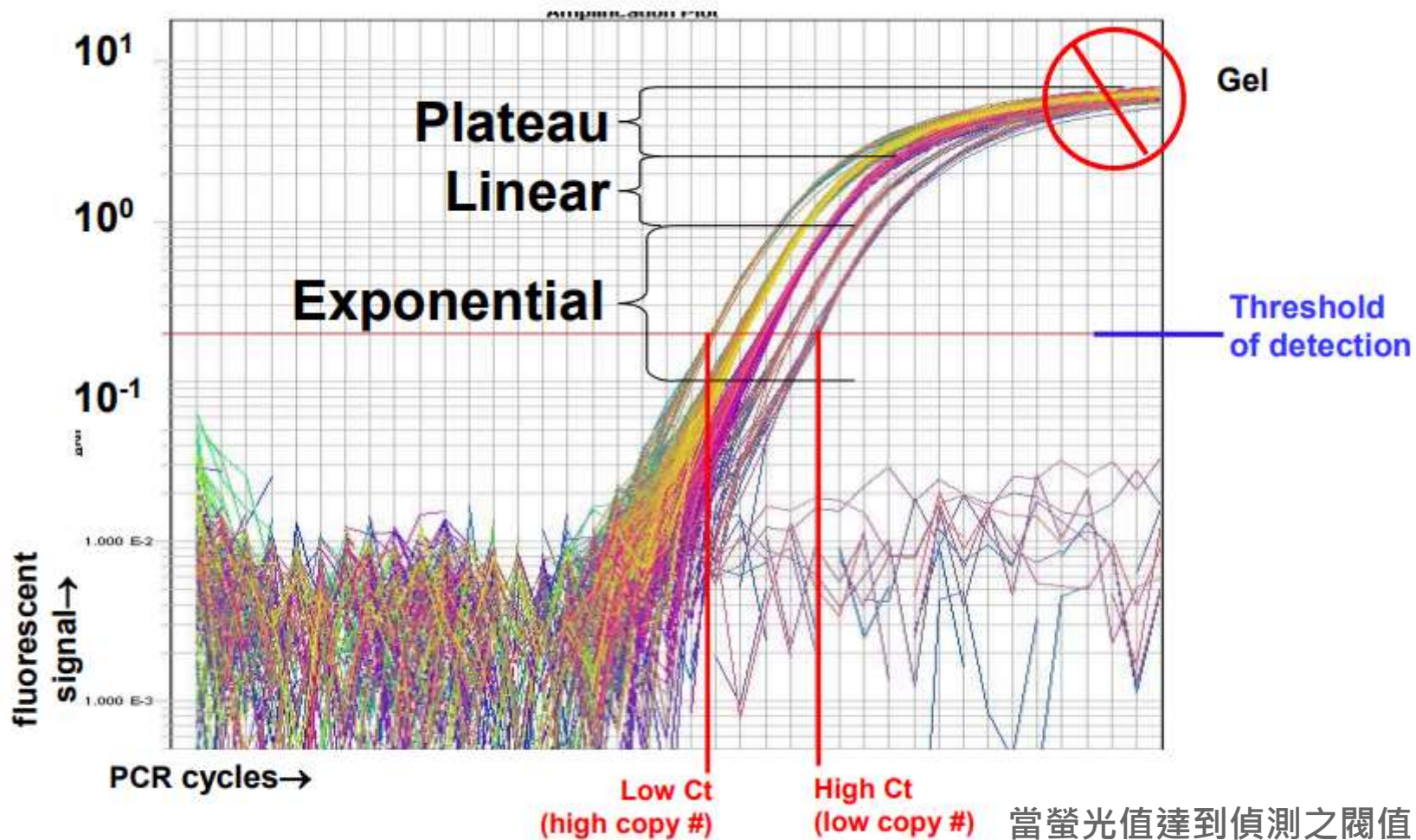


Real time PCR



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

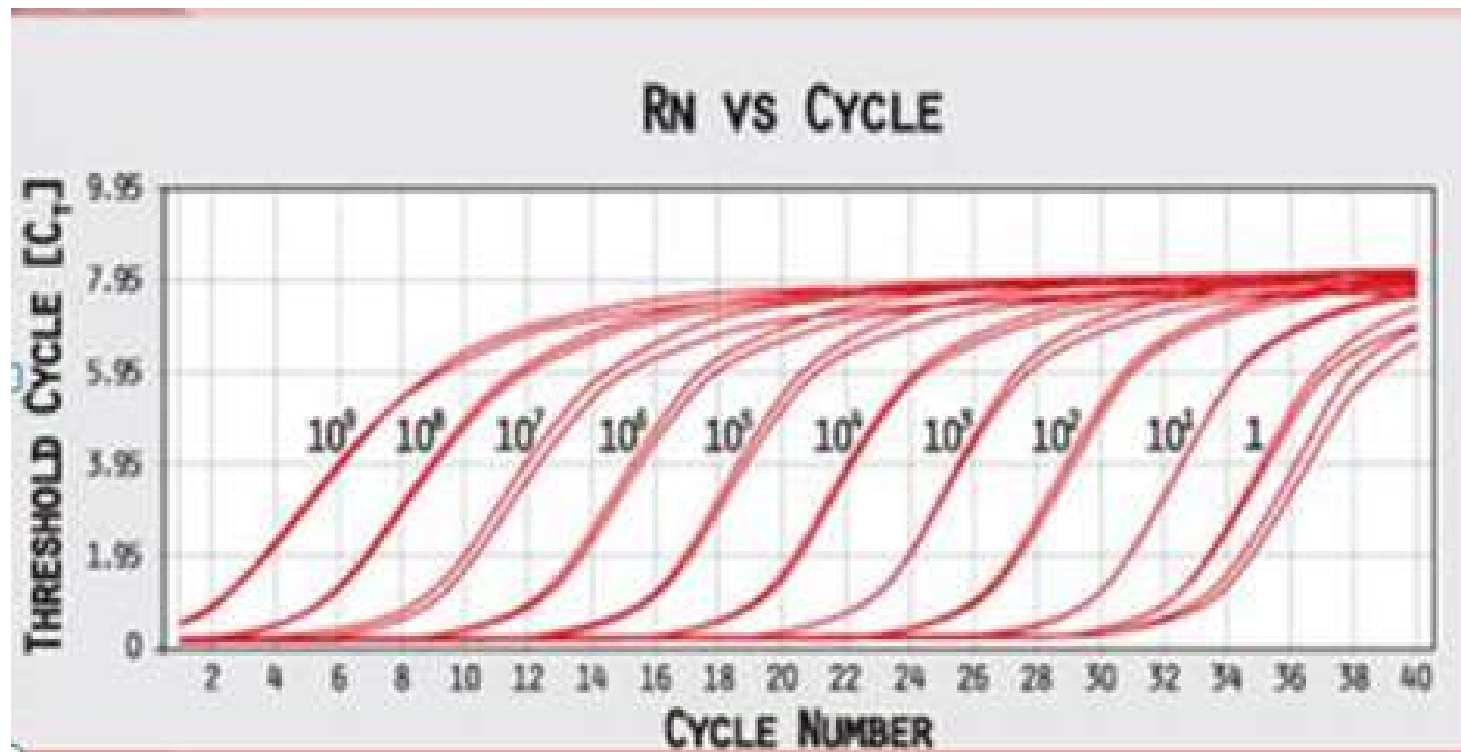




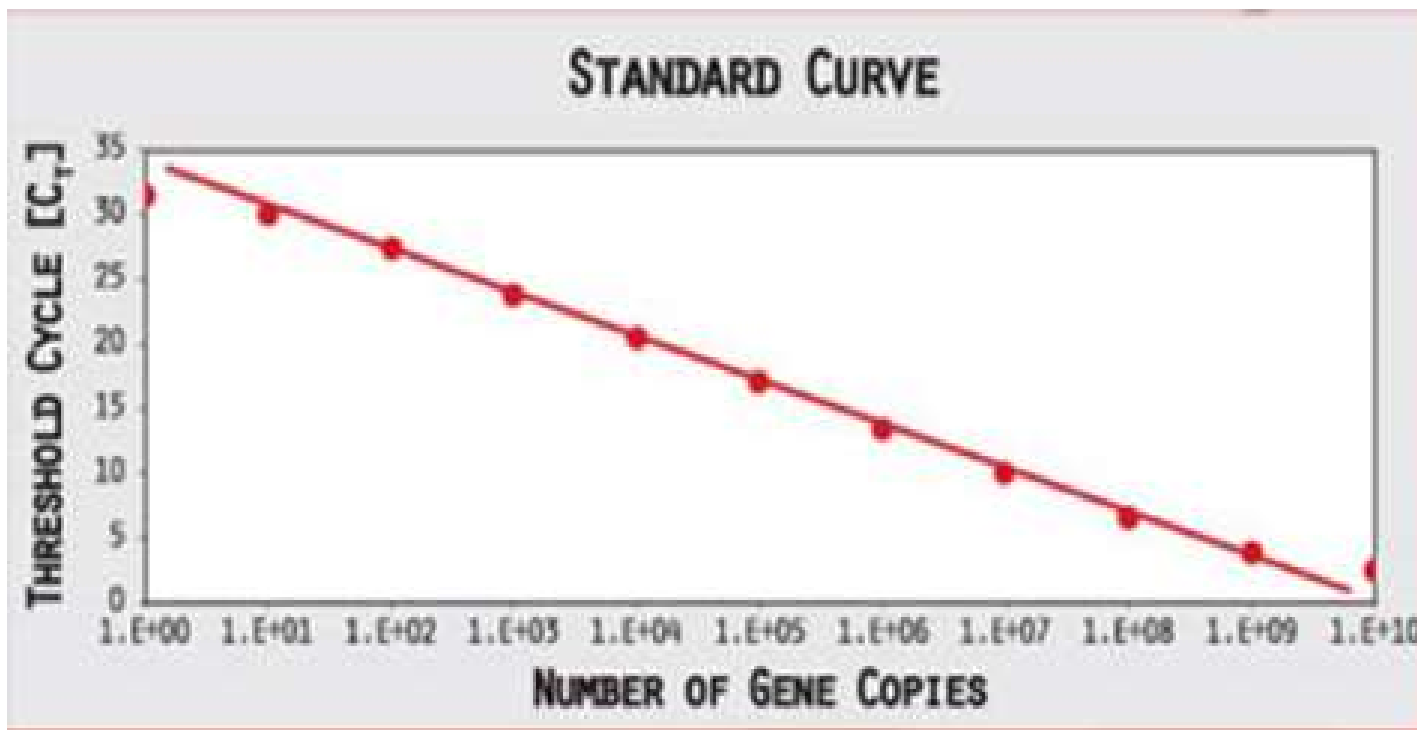
$Y = N_0 2^n$, C_T 與起始濃度之對數值成反比

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 C_t 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



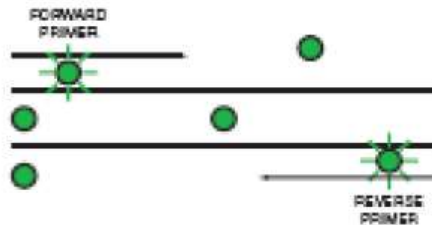
Step 1: Reaction setup

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



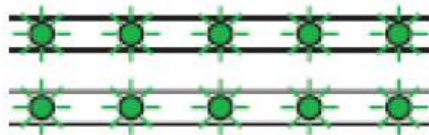
Step 2: Denaturation

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.

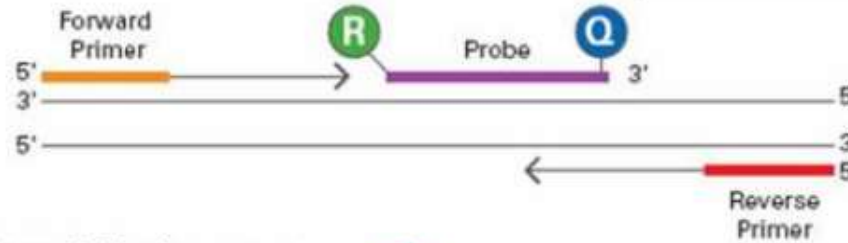
DNA binding dye-SYBR Green

- 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

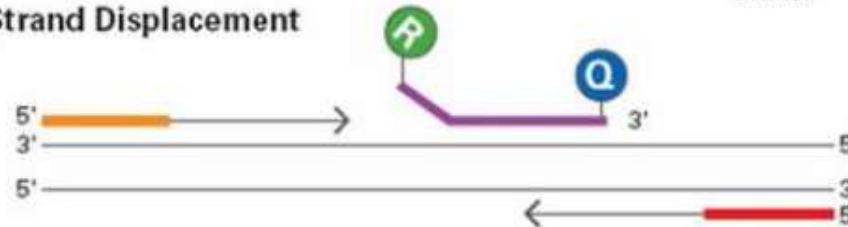
Fluorescent probe-TaqMan

Polymerization

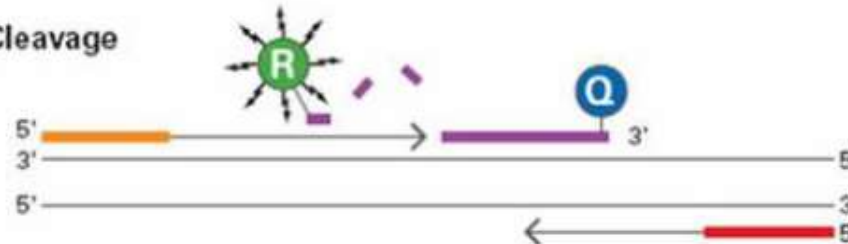
R = Reporter
Q = Quencher



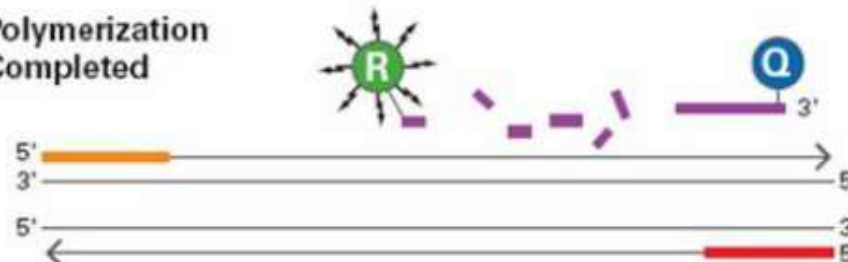
Strand Displacement



Cleavage



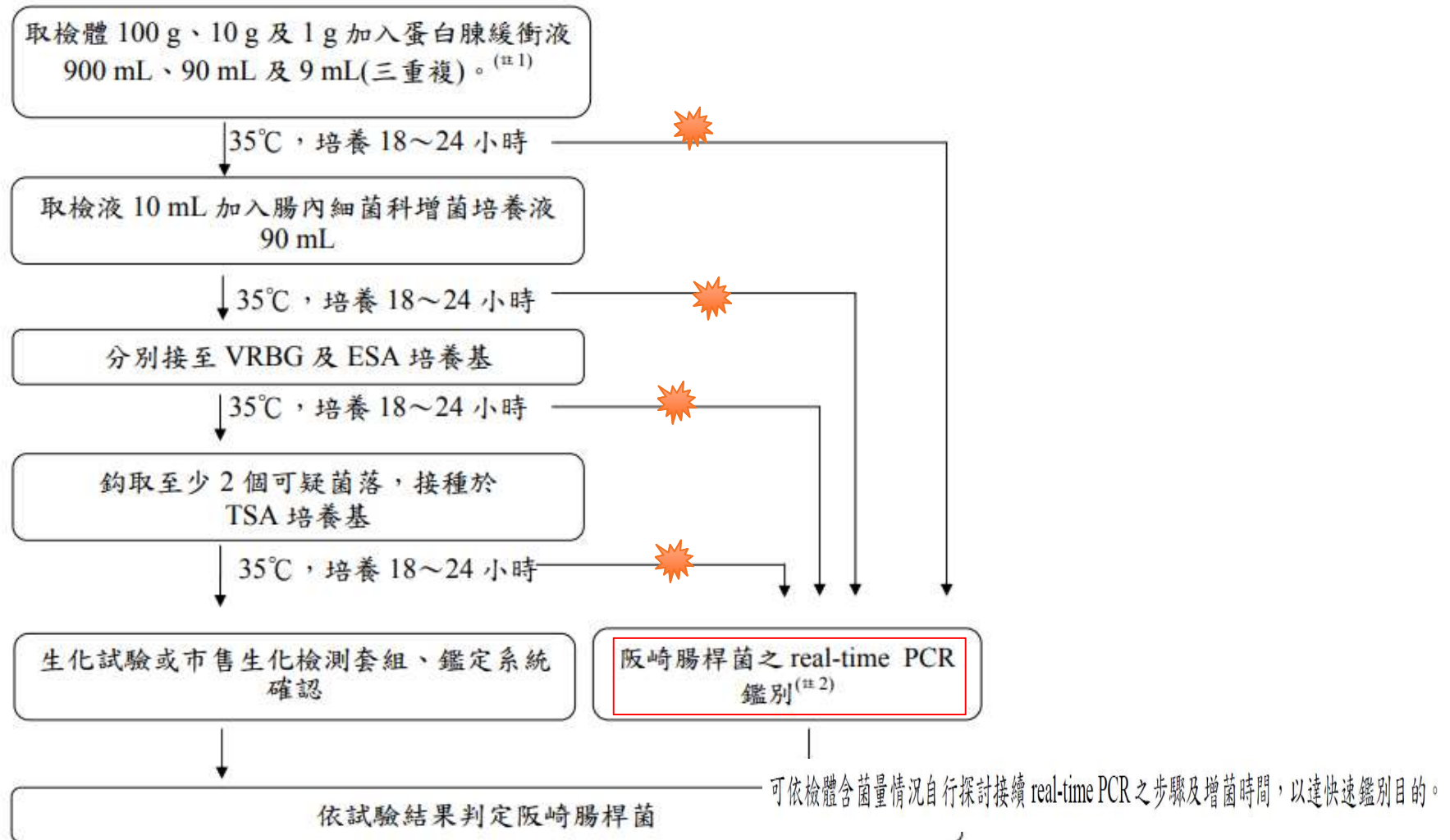
Polymerization Completed



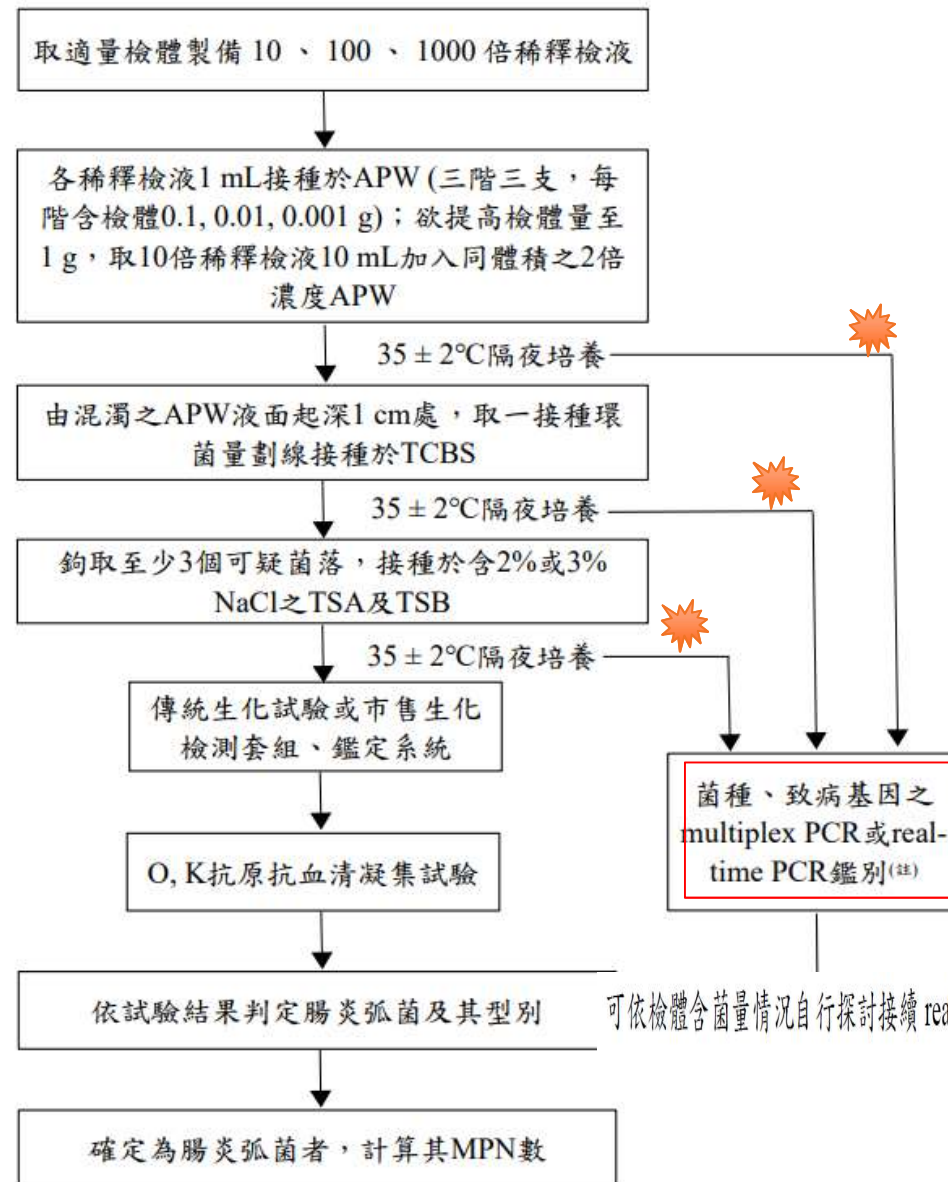
Fluorescent probe-TaqMan

- 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，

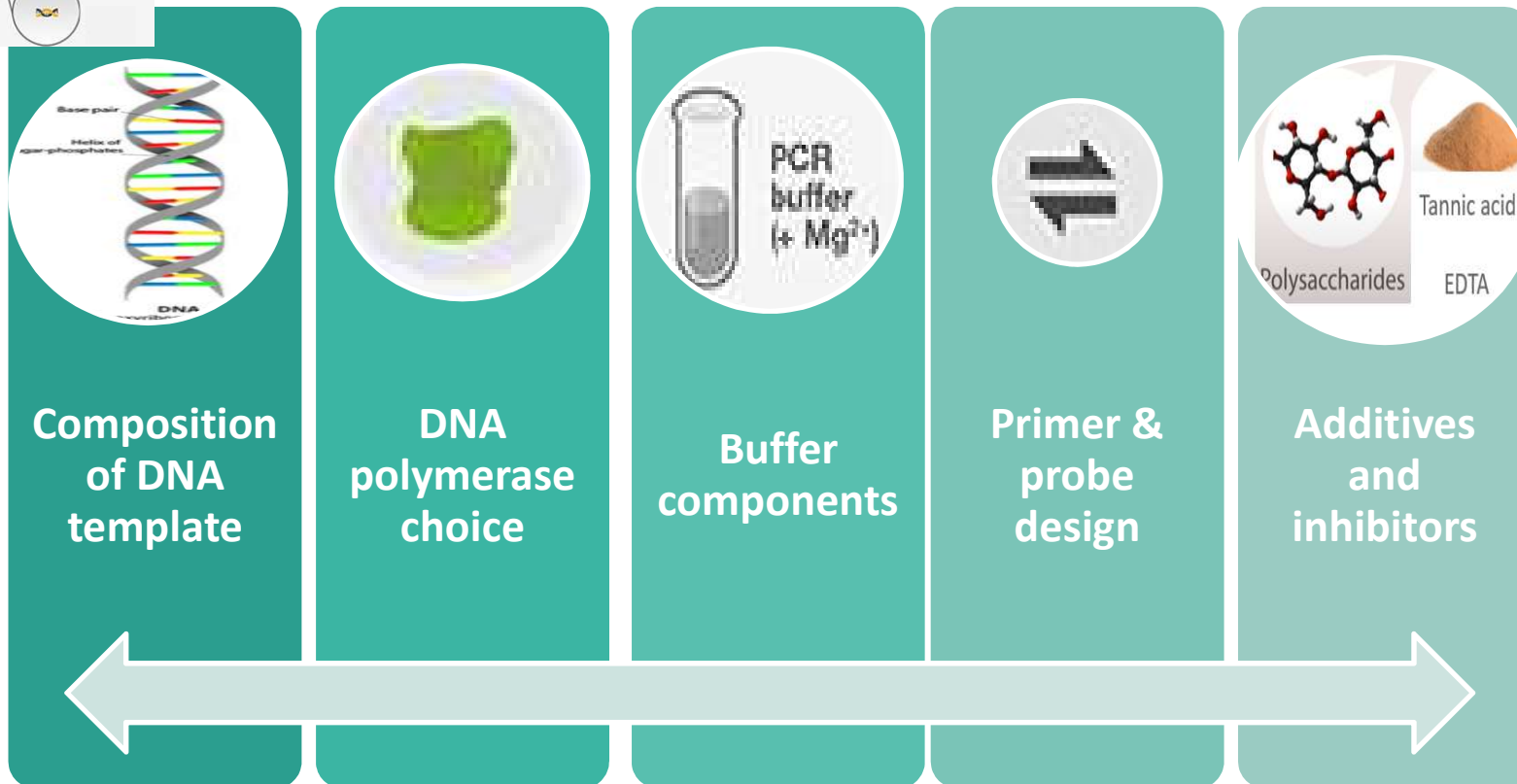
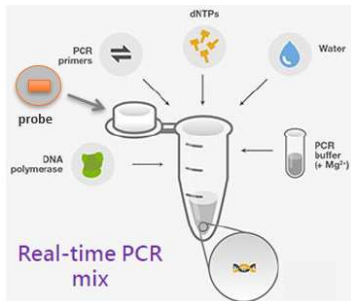
阪崎腸桿菌檢驗流程圖



腸炎弧菌檢驗流程圖



Important factors in real-time 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，置於-20℃冷凍保存。

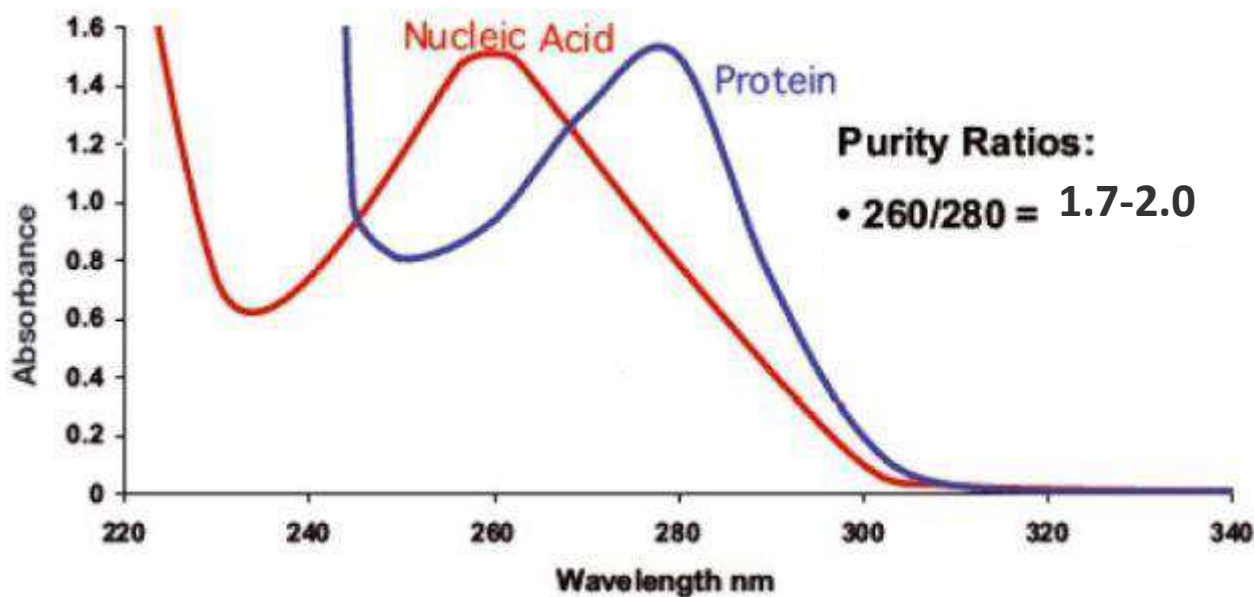
2.6.1.2. 抽取 DNA 法

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℃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。



引子與探針設計

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針

2.3.2.1.1. 阪崎腸桿菌鑑別基因(標的基因：MMS operon)

引子 F：5'- GGG ATA TTG TCC CCT GAA ACA G -3'

引子 R：5'- CGA GAA TAA GCC GCG CAT T - 3'

探針 P：

5'-(FAM)- AGA GTA GTA GTT GTA GAG GCC GTG
CTT CCG AAA G -(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 78 bp

修飾種類 5'-	最大吸收波	最大釋放波	適用quencher
6-FAM	494 nm	520 nm	BHQ-1/Dabcyl/NFQ/TAMRA
JOE	520 nm	548 nm	BHQ-1/Dabcyl/NFQ/TAMRA
Yakima Yellow	526 nm	548 nm	BHQ-1/Dabcyl/NFQ/TAMRA
HEX	535 nm	553 nm	BHQ-1/Dabcyl/NFQ/TAMRA
Cy3	547 nm	563 nm	BHQ-2/Dabcyl/NFQ
TAMRA	555 nm	576 nm	BHQ-2/Dabcyl/NFQ
ROX	575 nm	602 nm	BHQ-2/NFQ
Texas Red	595 nm	615 nm	BHQ-2/NFQ
Cy5	646 nm	662 nm	BHQ-2/BHQ-3/NFQ

引子與探針設計

腸炎弧菌菌種鑑別基因(標的基因：tlh)

引子F：5'-ACTCAACACAAGAAGAGATCGACAA-3'

引子R：5'-GATGAGCGGTTGATGTCCAA-3'

探針P：5'-(FAM)-CGCTCGCGTTCACGAAACCGT-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小207 bp

腸炎弧菌致病基因(標的基因：tdh)

引子F：5'-AAACATCTGCTTTTGAGCTTCCA-3'

引子R：5'-CTCGAACAACAAACAATATCTCATCAG-3'

探針P：5'-(FAM)-TGTCCTTTTCCTGCCCCCGG-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小74 bp

腸炎弧菌致病基因(標的基因：trh)

引子F：5'-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3'

引子R：5'-ACGATTGCGTTAACTGGTGAT-3'

探針P：5'-(FAM)-CATTCGCGATTGACCTACCATCCA-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小139 bp

修飾種類 5'	最大吸收波	最大釋放波	適用quencher
6-FAM	494 nm	520 nm	BHQ-1/Dabcyl/NFQ/TAMRA
JOE	520 nm	548 nm	BHQ-1/Dabcyl/NFQ/TAMRA
Yakima Yellow	526 nm	548 nm	BHQ-1/Dabcyl/NFQ/TAMRA
HEX	535 nm	553 nm	BHQ-1/Dabcyl/NFQ/TAMRA
Cy3	547 nm	563 nm	BHQ-2/Dabcyl/NFQ
TAMRA	555 nm	576 nm	BHQ-2/Dabcyl/NFQ
ROX	575 nm	602 nm	BHQ-2/NFQ
Texas Red	595 nm	615 nm	BHQ-2/NFQ
Cy5	646 nm	662 nm	BHQ-2/BHQ-3/NFQ

修飾種類	Effective absorbance range
BHQ-1	480-580 nm, Max= 534 nm
BHQ-2	550-650 nm, Max= 579 nm
BHQ-3	620-730 nm, Max= 680 nm
Dabcyl	400-500 nm, Max= 479 nm
NFQ	390-625 nm, Max= 522 nm
TAMRA	Ex= 555 nm, Em= 576 nm

阪崎腸桿菌反應條件

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. 阪崎腸桿菌菌種鑑別基因反應條件

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	52°C	40 sec
步驟 2 至步驟 3，共進行 40 個循環反應。		

腸炎弧菌反應條件

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.....	1.5 µL
TaqMan® Fast Reagents Starter Kit.....	12.5 µL
檢體DNA溶液.....	5.0 µL
無菌去離子水.....	2.0 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。

Tlh (thermolabile hemolysin)不耐熱性溶血素
Tdh (thermostable direct hemolysin)耐熱性溶血素
Trh (TDH related hemolysin)類耐熱性溶血素

2.7.1.1. 腸炎弧菌菌種鑑別基因(*tlh*)反應條件

步驟	溫度(°C)	時間(sec)
1. 熱活化	95	20
2. 最初變性	95	5
3. 黏接、延展	59	45

步驟2至步驟3，共進行40個循環反應。

2.7.1.2. 腸炎弧菌致病基因(*tdh*)反應條件

步驟	溫度(°C)	時間(sec)
1. 熱活化	95	20
2. 最初變性	95	5
3. 黏接、延展	60	25

步驟2至步驟3，共進行40個循環反應。

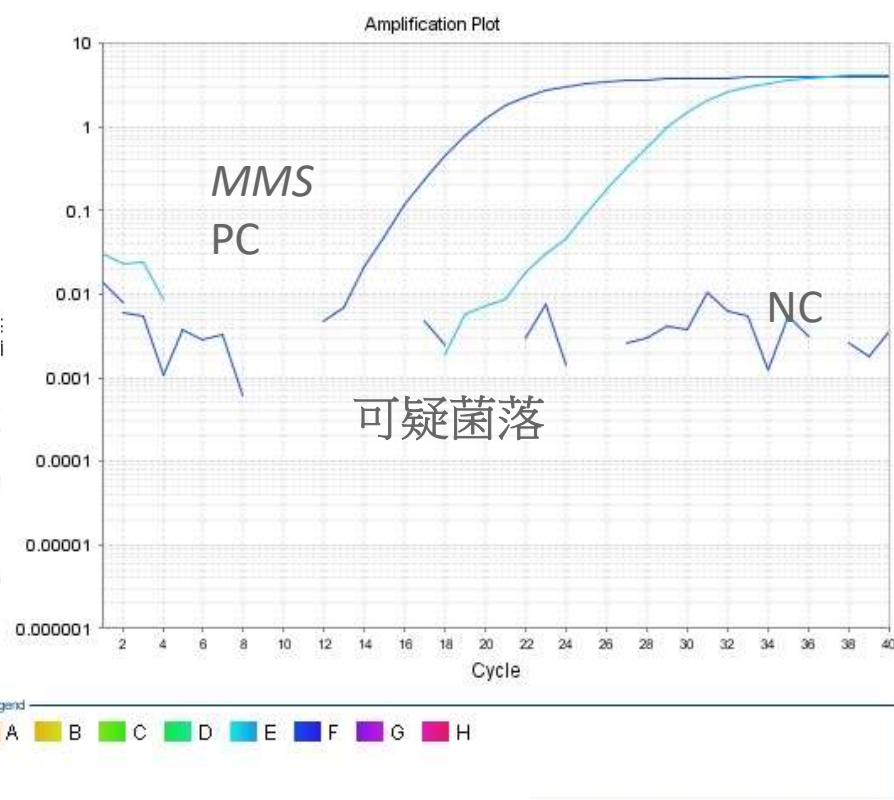
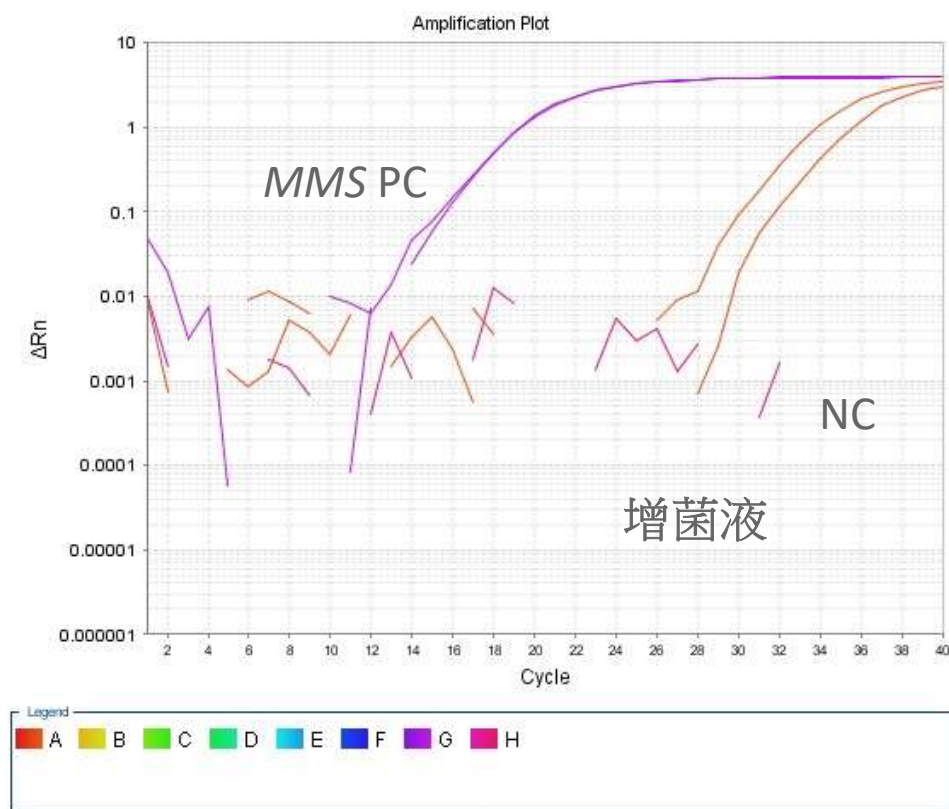
2.7.1.3. 腸炎弧菌致病基因(*trh*)反應條件

步驟	溫度(°C)	時間(sec)
1. 熱活化	95	20
2. 最初變性	95	5
3. 黏接、延展	54	30

步驟2至步驟3，共進行40個循環反應。



阪崎腸桿菌Real-time PCR 反應結果

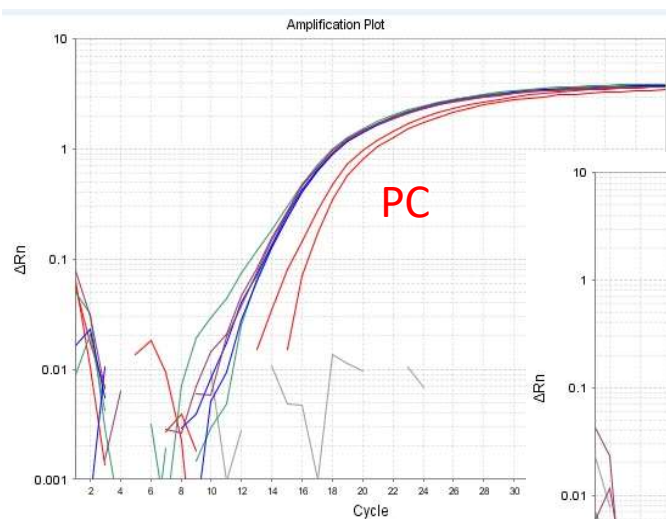


註4：可依檢體含菌量情況自行探討接續 real-time PCR 之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。

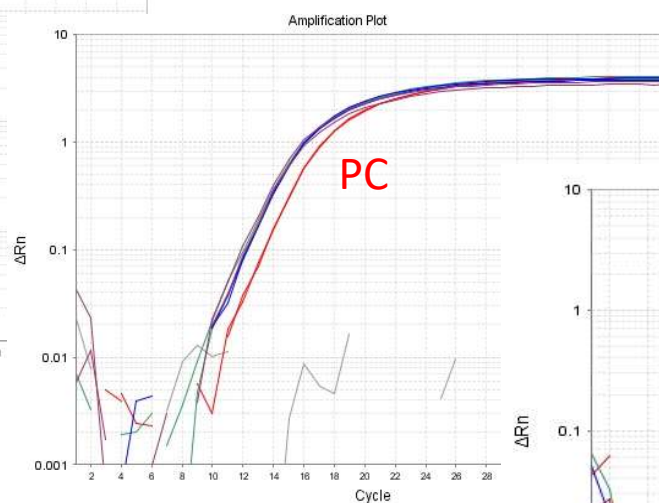


衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

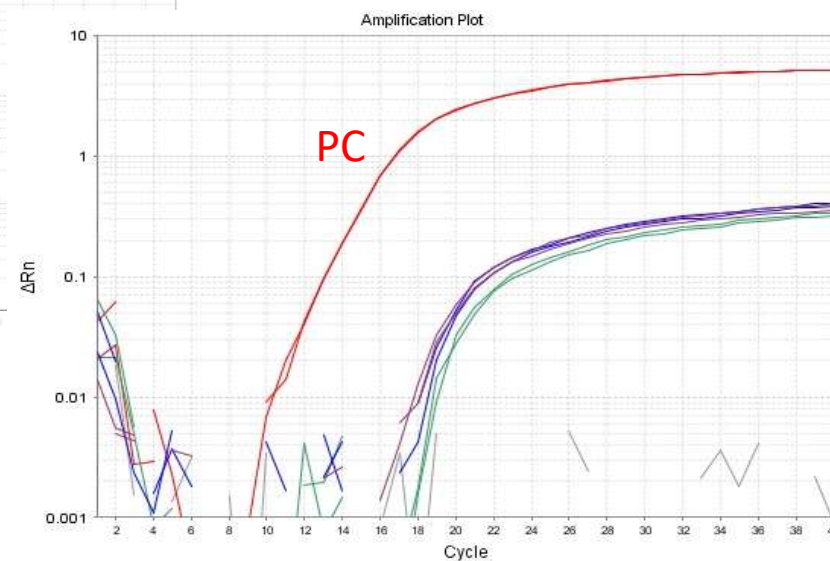
腸炎弧菌Real-time PCR反應結果



菌種鑑別基因(*tih*)



致病基因(*tdh*)



致病基因(*trh*)

腸炎弧菌Multiplex PCR反應條件

2.3.2.1.1. 腸炎弧菌菌種鑑別基因(標的基因：thermolabile hemolysin, *tlh*)

引子F：L-TL, 5'-AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG-3'

引子R：R-TL, 5'-GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC-3'

PCR增幅產物大小450 bp

2.3.2.1.2. 腸炎弧菌致病基因

2.3.2.1.2.1. 標的基因：thermostable direct hemolysin (*tdh*)

引子F：VPTDH-L, 5'-GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3'

引子R：VPTDH-R, 5'-TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC-3'

PCR增幅產物大小270 bp

2.3.2.1.2.2. 標的基因：thermostable related hemolysin (*trh*)

引子F：VPTRH-L, 5'-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3'

引子R：VPTRH-R, 5'-CATAACAAACATATGCCCATTTCCG-3'

PCR增幅產物大小500 bp

2.5.6. Multiplex PCR溶液^(註4)

10倍含15 mM氯化鎂之PCR緩衝溶液..... 5.0 µL

Taq DNA polymerase (2 U/µL)..... 1.0 µL

2.5 mM dNTP..... 8.0 µL

10 µM 引子 L-TL..... 1.25 µL

10 µM 引子 R-TL..... 1.25 µL

10 µM 引子 VPTDH-L..... 1.25 µL

10 µM 引子 VPTDH-R..... 1.25 µL

10 µM 引子 VPTRH-L..... 1.25 µL

10 µM 引子 VPTRH-R..... 1.25 µL

檢體 DNA 溶液..... 1.0 µL

無菌去離子水..... 27.5 µL

總體積..... 50.0 µL

2.7.2. Multiplex PCR條件

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	94°C	35 min
2. 變性	94°C	1 min
3. 黏接	60°C	1 min
4. 延展	72°C	2 min
步驟2至步驟4，共進行35個循環反應。		
5. 最終延展	72°C	3 min



Real-time PCR

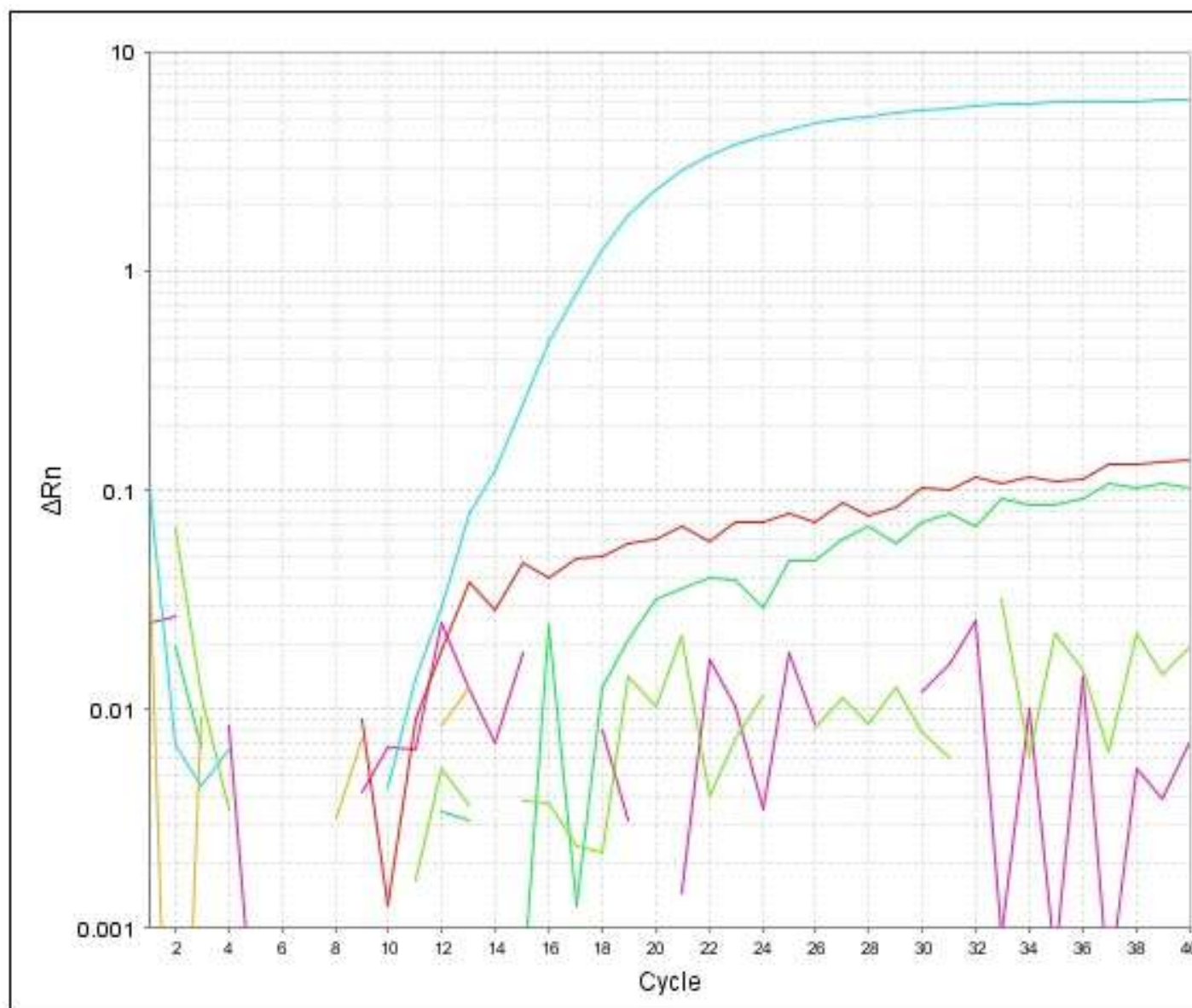


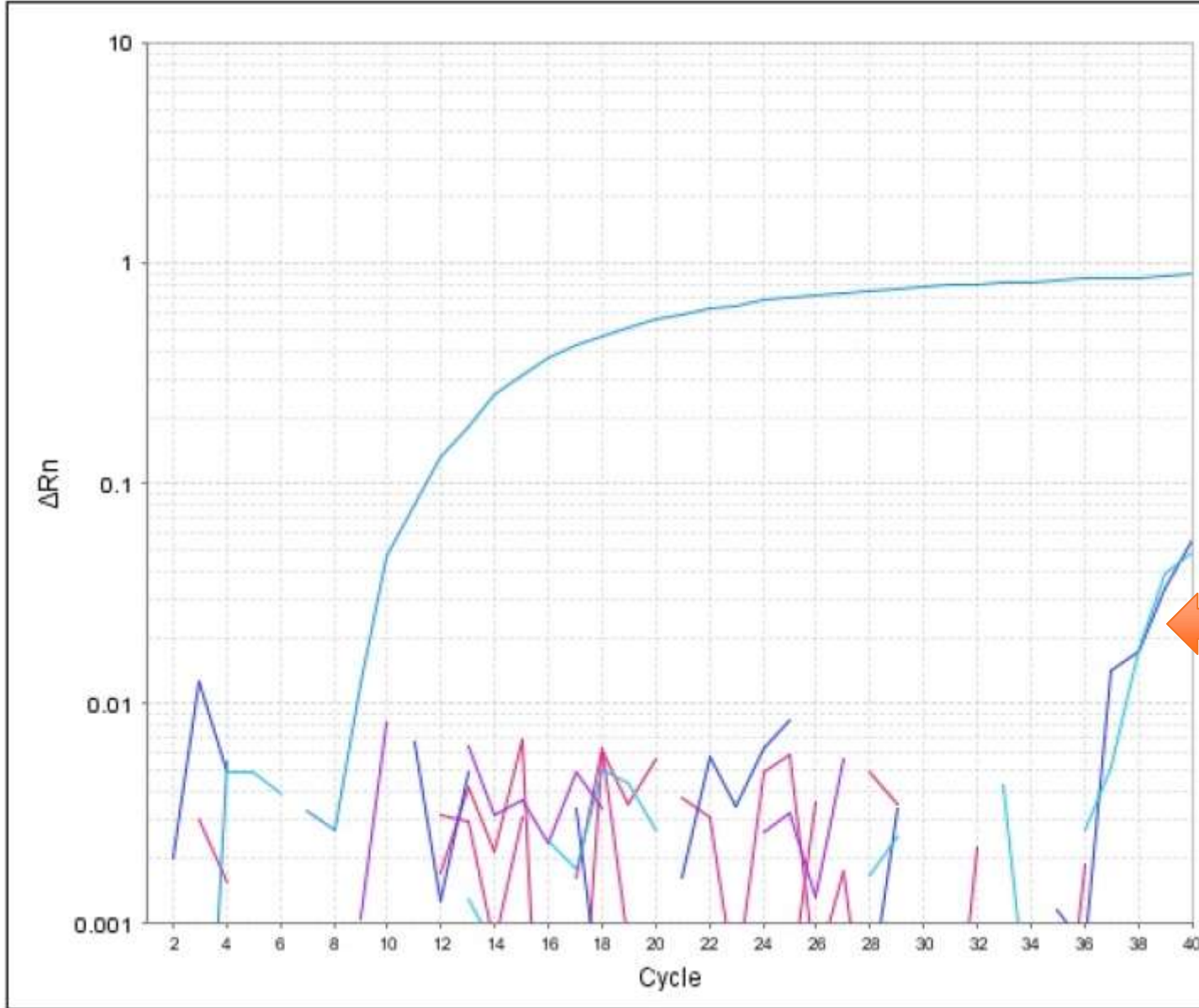
Trouble Shooting

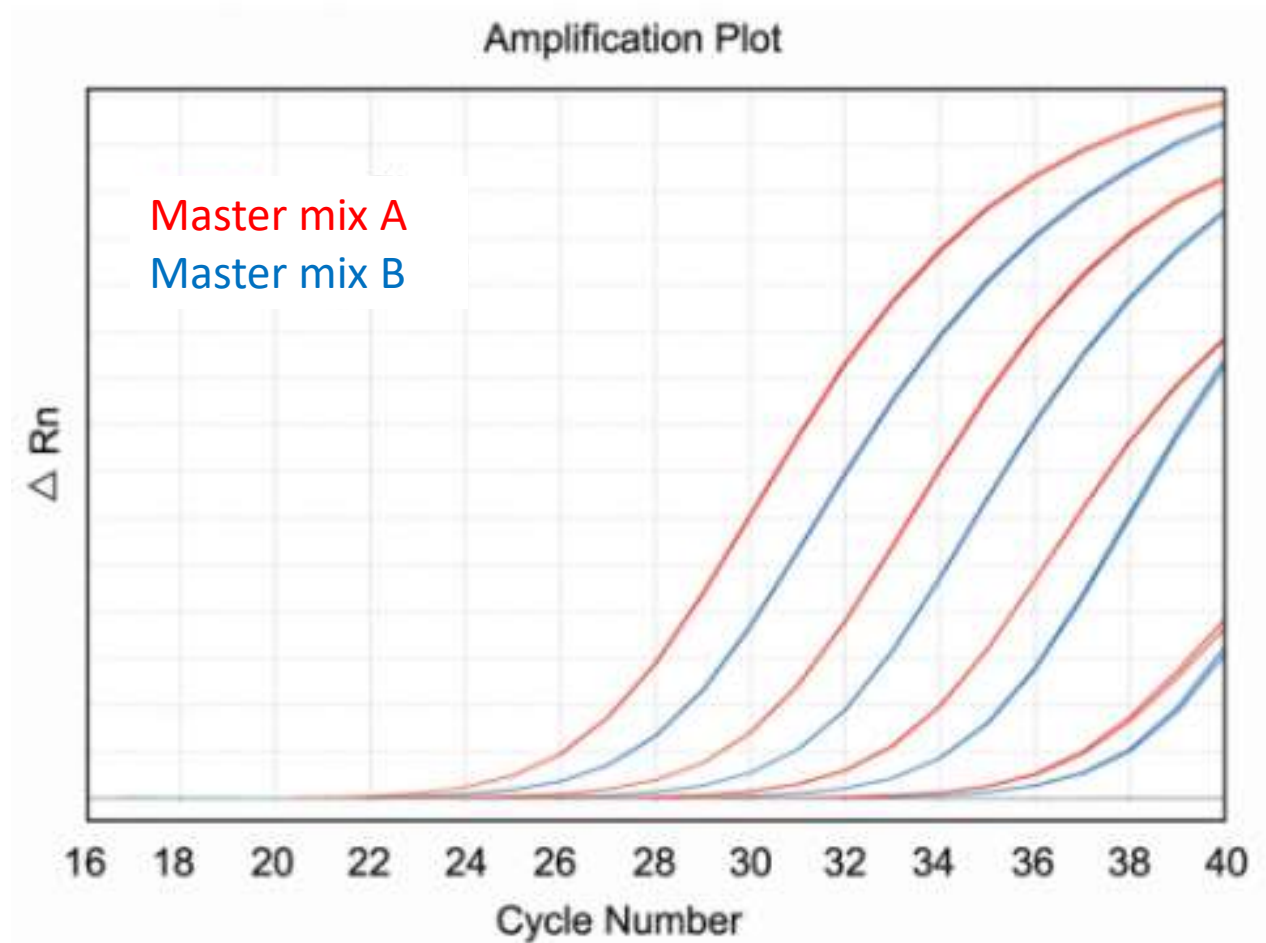
Q: 沒訊號??

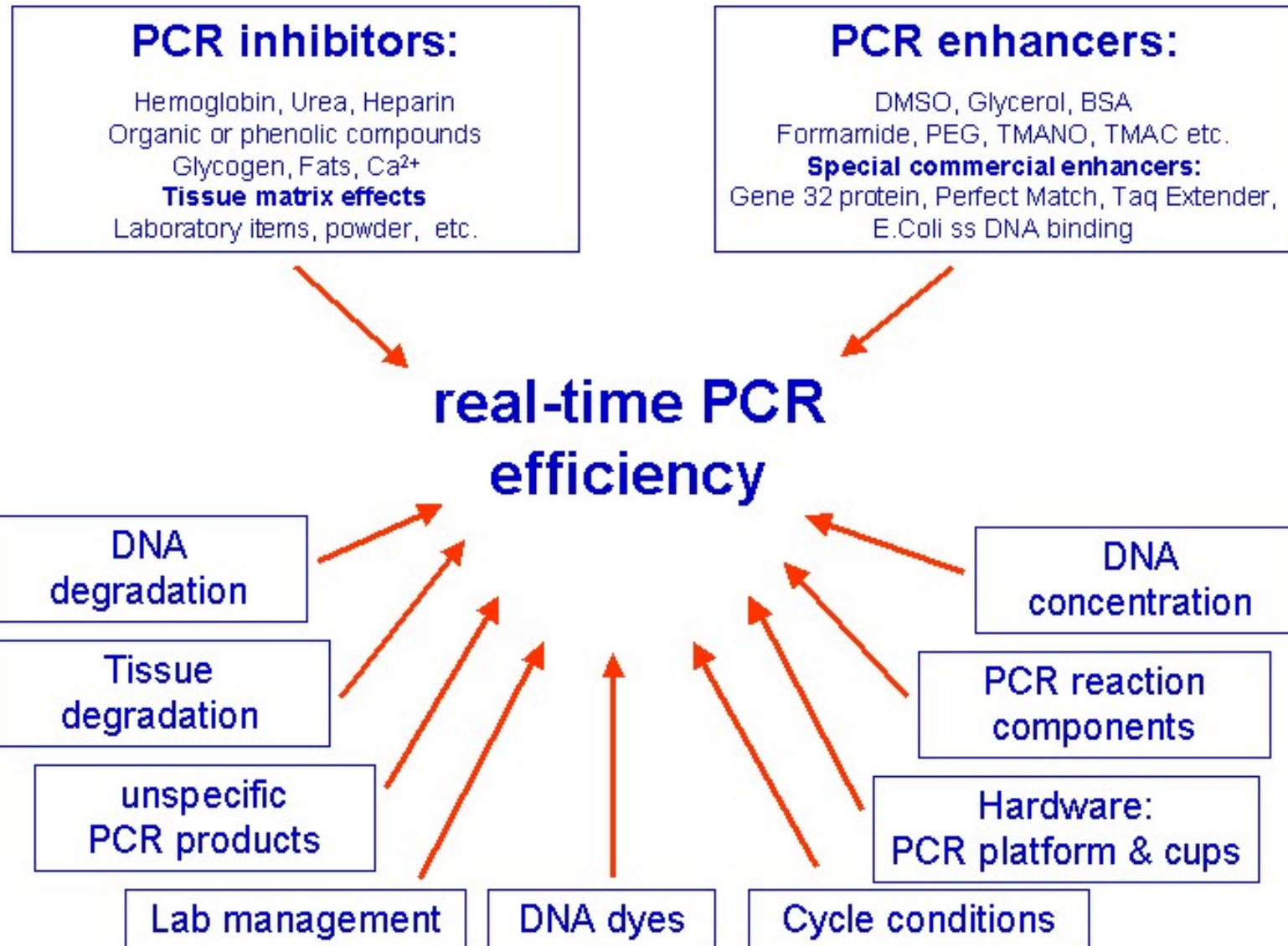
Q: 曲線圖很??

Q: Ct 值很低，不確定？









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
Taiwan Food and Drug Administration

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