

Code No. RR267

研究用

TaKaRa

TaKaRa PCR *Listeria*
monocytogenes Detection Kit
(multi-PCR) China Standard

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 注意事项	1
● 操作方法	2
● 结果判定	3

● 制品说明

李斯特氏菌是革兰氏阳性的、有鞭毛、无芽孢的短杆菌（0.4~0.5×0.5~2.0 μm）。在分类学上属于李斯特氏菌属，这个属共有 8 种菌。其中只有 *Listeria monocytogenes* 菌是引起人李斯特氏菌症的病原菌。能引起发热、头痛的同时会引发髓膜炎、败血症、心内膜炎、肺炎等多发性病症。1980 年以来作为集体食物中毒的病原菌（即食物中毒病原菌）引起人们注意。

本试剂盒是根据中华人民共和国出入境检验检疫行业标准《SN/T 0184.2-2006 食品中单核细胞增生李斯特氏菌检测方法 第 2 部分：多重 PCR 方法》开发的用于检测 *Listeria monocytogenes* 的 multiplex PCR 试剂盒。Tks Gflex DNA Polymerase 是在 *Thermococcus* 属古细菌由来的 DNA Polymerase 的基础上进行改良的 PCR 聚合酶，该酶能够有效抑制酶与模板 DNA 的非特异性结合。并具有 α 型酶特有的高保真性和优良的扩增性。同时体系中添加了 Takara 特别研发的延伸因子和提高引物特异性的物质，可以在很宽的模板浓度范围内进行高速、特异性强的 PCR 扩增。对于普通 PCR 酶难扩增（含有 PCR 阻害物）的 GC Rich、AT Rich 的目的基因均可进行有效扩增。另外其中还添加了能够吸附 PCR 阻害物的成份和扩增增强因子，对于粗提样品也能进行高效的 PCR 扩增。

本酶添加了在常温下能够抑制 DNA Polymerase 活性及 3' → 5' exonuclease 活性的抗体，是 Hot Start 型 DNA 聚合酶。本检测简单快速，灵敏度高，特异性强。

● 制品内容 (50 μl 反应×40 次)

1. 2X Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ ,dNTP plus)	1 ml
2. Tks Gflex™ DNA Polymerase (1.25 U/ μl)	40 μl
3. <i>L.mono</i> HA1 Primer (20 μM)	60 μl
4. <i>L.mono</i> HA2 Primer (20 μM)	60 μl
5. <i>L.mono</i> MonoA Primer (20 μM)	100 μl
6. <i>L.mono</i> LisB Primer (20 μM)	100 μl
7. <i>L.mono</i> Positive Control (2×10 ⁴ copies/ μl) *1	75 μl
8. RNase Free dH ₂ O	1 ml

*1 *L.mono* Positive Control 仅作为反应性能监测的对照，浓度仅供参考。实验时请用阳性标本提取的 DNA 作为阳性对照。

【各种引物序列】

引物名称	引物序列	扩增片段大小
<i>L.mono</i> HA1 Primer	5' - GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA -3'	456 bp
<i>L.mono</i> HA2 Primer	5' - GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG -3'	
<i>L.mono</i> MonoA Primer	5' - CAAACTGCTAACACAGCTACT -3'	702 bp
<i>L.mono</i> LisB Primer	5' - TTATACGCGACCGAAGCCAA -3'	

L.mono HA1 Primer / *L.mono* HA2 Primer 扩增溶血素基因；*L.mono* MonoA Primer / *L.mono* LisB Primer 扩增 P60 蛋白的编码基因。

● 保存： -20℃。

● 注意事项

1. 根据中华人民共和国出入境检验检疫行业标准《SN/T 0184.2-2006 食品中单核细胞增生李斯特氏菌检测方法 第 2 部分：多重 PCR 方法》，使用本试剂盒方法判断为阳性的样品，建议再选用其他方法，如：API、生化鉴定和协同溶血（cAMP）试验等，进行进一步确认。

2. 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。

● 操作方法

1. 样品的制备 (在区域 2 进行)

建议采用《SN/T 0184.2-2006 食品中单核细胞增生李斯特氏菌检测方法 第 2 部分: 多重 PCR 方法》中的方法。

2. 反应液的配制

本制品可在同一反应管中对溶血素基因和 P60 蛋白的编码基因同时进行扩增检测。为了得到正确的检测结果, 应该同时进行阳性对照反应 (Positive Control) 和阴性对照反应 (灭菌水)。

(1) 在冰上配制如下反应液 (在区域 1 进行)

除检测样品外, 其他各反应组份应先按检测样品数+3 的量 (含阳性对照、阴性对照) 配制 Master Mix, 取配制好的 Master Mix 45 μ l 分装到 0.2 ml Tube 管中, 盖上反应管盖。

试剂	使用量	终浓度
2X Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	25 μ l	1X
Tks Gflex DNA Polymerase	1 μ l	
<i>L.mono</i> HA1 Primer (20 μ M)	1.5 μ l	0.6 μ M
<i>L.mono</i> HA2 Primer (20 μ M)	1.5 μ l	0.6 μ M
<i>L.mono</i> MonoA Primer (20 μ M)	2.5 μ l	1 μ M
<i>L.mono</i> LisB Primer (20 μ M)	2.5 μ l	1 μ M
检测样品或阳性对照或灭菌水	5 μ l*	
RNase Free dH ₂ O	11 μ l	
Total	50 μ l	

* 在这个阶段不添加检测样品等模板。

(2) 样品 (模板) 的添加 (在区域 3 进行)。

一管作为阴性对照加入灭菌水, 剩余的管里加入样品或 *L.mono* Positive Control, 盖紧反应管盖。

(3) 将 0.2 ml Tube 用小型离心机进行轻微离心, 放入 PCR 仪上。

3. Real Time PCR 仪

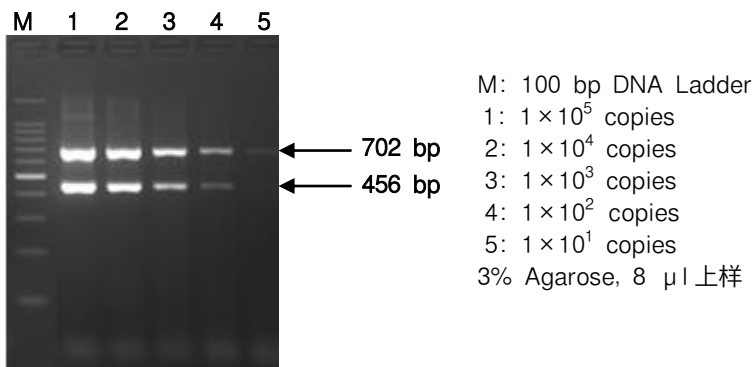
Thermal Cycler Dice™ Real Time System // (Code No. TP900)

4. 按以下条件进行 PCR 反应

95°C	3 min.	
↓		
95°C	45 sec.	} 40 cycles
62°C	30 sec.	
72°C	45 sec.	
72°C	3 min.	
4°C	∞	

反应结束后, 取 8 μ l PCR 反应液进行琼脂糖凝胶 (3% Agarose) 电泳, 确认 PCR 扩增产物。

● 结果判定



Positive Control 扩增电泳图

说明:

- (1) 扩增的电泳图像显示, 在 50 bp 以下位置出现电泳带。这是由于引物间形成引物二聚体(Primer dimer)的结果。
- (2) 由于本试剂盒的 RCR 扩增性能较强, 易形成一些非特异性扩增。在进行结果判定时可以不予考虑, 不影响特异性 PCR 扩增结果。
- (3) 本试剂盒中的 Positive Control 是质粒, 用于对试剂的反应性能进行监测, 如有需要, 请采用阳性菌株制备的 DNA 作为阳性对照。
- (4) 不同的菌株扩增的片段大小会稍有偏差, 可以不予考虑。

【出现下列电泳结果, 可以作出相应判断】

电泳结果	结果判断
Positive Control 检测到 702 bp, 456 bp 两条目的片段, 样品出现任一扩增片段或两者均出现, 阴性对照无扩增。	阳性
Positive Control 检测到 702 bp, 456 bp 两条目的片段, 样品无扩增, 阴性对照无扩增。	阴性
Positive Control 未检测到 702 bp, 456 bp 两条目的片段	PCR 反应失败
Negative Control 实验中有 702 bp, 456 bp 任一扩增片段或两者均出现	PCR 反应体系污染。请在确保 PCR 反应体系不被污染的情况下再次进行 PCR 反应。

判定标准参照行业标准《SN/T 0184.2-2006 食品中单核细胞增生李斯特氏菌检测方法 第 2 部分: 多重 PCR 方法》。

Tks Gflex and Thermal Cycler Dice are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准, 不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品, 或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权, 请联络我们, 或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>