

荧光定量 PCR 法

快速检测食品中病原微生物

核心技术：荧光定量 PCR 技术

PCR 检测技术是检测生物体内核酸的方法，现在发展为普通的常规 PCR 和实时荧光 PCR 两种应用，它们都具有 PCR 技术本身的高灵敏度和高特异性的特点，但实时荧光 PCR 技术额外加入特异的荧光分子探针，进行鉴别，因此结合了分子鉴别方法，具有更高的特异性。另外普通 PCR 技术的结果检测为肉眼观察的电泳结果，灵敏度远远低于荧光仪器的检测灵敏度。最后，如果加入已知浓度的标准品，还可以得出病原体的定量结果。因此可以说，实时荧光 PCR 技术集 PCR 和分子鉴别技术于一身，又具有定量的功能，可以进行病原体 and 病情监督。罗氏诊断公司移动式实时荧光定量 PCR 系统的特点

罗氏公司是全球 PCR 专利技术的拥有者，同时也是实时 PCR 专利技术、杂交探针技术和水解探针技术的专利注册者，罗氏公司的 PCR 诊断检测系统也是唯一一家通过 FDA 认证，国际公认的 PCR 检测金标准，结合了创新专利和德国精工制造的实时荧光定量 PCR 系统——LightCycler，更是被广泛应用于各种病原微生物、病毒的临床检测，成为荧光 PCR 仪器的领导者；而移动式 LightCycler 则是针对应急情况，实现灵活机动、实地快速检测，专门设计的一套系统。

荧光定量 PCR 方法与传统方法的比较（时间及灵敏度）

培养方法	检测水平（细胞数/毫升）	检测时间
培养	$10^7 \sim 10^8$	4~6 天
ELISA（酶联免疫）	$10^5 \sim 10^7$	48 小时
DNA 探针	10^6	48~72 小时
PCR（培养）	10^3	< 24 小时
荧光定量 PCR（不培养）	10^5	2 小时

可检测的细菌种类

包括 SARS 病毒、炭疽杆菌、沙门氏菌、李斯特菌、肠道菌、白色粘珠菌、铜绿假单胞菌、葡萄球菌、EB 病毒、单纯疱疹病毒、细小病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、艾滋病病毒、禽流感病毒、淋球菌、沙眼衣原体、解脲支原体等。

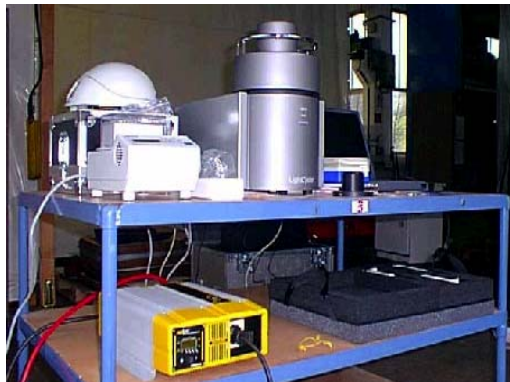
3330028	LightCycler - EBV Quantification Kit	1 kit (48 samples)
3315177	LightCycler - HSV 1/2 Detection Kit	1 kit (48 samples)
3303411	LightCycler - Bacillus anthracis Detection Kit	1 kit (14 samples)
3246809	LightCycler - Parvo B19 Quantification Kit	1 kit (48 samples)
3246795	LightCycler - Hepatitis A Virus Quantification Kit	1 kit (48 samples)
3375048	LightCycler - Enterococcus Kit <i>M Grade</i>	1 kit (48 samples)
3376419	LightCycler - Staphylococcus Kit <i>M Grade</i>	1 kit (48 samples)
3375030	LightCycler - Pseudomonas Kit <i>M Grade</i>	1 kit (48 samples)
3357961	LightCycler - Candida Kit <i>M Grade</i>	1 kit (48 samples)
3357449	LightCycler - Salmonella Detection Kit	1 kit (96 reaction)
3358089	High Pure Salmonella Detection Kit	100 isolations
3358097	Salmonella ShortPrep Kit	96 isolations
3357457	LightCycler - Listeria monocytogenes Detection Kit	1 kit (96 reaction)
3358054	High Pure Listeria Sample Preparation Kit	100 isolations
3358062	Listeria ShortPrep Kit	96 isolations

一、 现场型

1) 示意图



移动式 LightCycler 主机系统



实地检测示意图

2) 设备组成

1. LightCycler 实时荧光定量 PCR 仪
2. 笔记本电脑
3. 电压转换器 (12V→220V)
4. 取样手提箱
5. 掌上离心机 (最大转速 12500g)
6. 干热器
7. 加样器 (三种规格: 0.1-2.5ul; 2-20ul; 20-200ul;)
8. 军用防撞箱 (80cmX60cmX60cm)

3) 操作流程及运行时间

阶段	步骤	所需时间
1	裂解样本 (干热器+裂解液)	半小时
2	提取细菌 DNA (干热器+ROCHE High pure 核酸纯化试剂盒) / (第 2 步)	2-3 小时
3	快速 DNA 扩增 (Lightcycler 2.0 定量 PCR 仪+食品微生物定量 PCR 检测试剂盒) / (第 3 步)	半小时
	全过程 (从第 1 步至第 3 步)	3-4 小时

4) 移动式 LightCycler 系统——杰出的专业化设计:

1. **检测速度快**, 比较常规微生物形态学、显微观察方法, 常规 PCR 和其它检测方法, 移动式 LightCycler 能够在 20-30 分钟得出检测结果, 远远超过其它方法 2-7 天的检测速度;
2. **能够机动、实地检测**, 对比其它检测方法, 需要依赖装备齐全的特殊生物安全实验室, 体积庞大, 设备繁多, 不能灵活机动, 而移动式 LightCycler 系统的军用级防撞箱, 能够保证仪器不受跋山涉水, 长途颠簸的限制, 确保仪器的优秀精度和完美的重复性; 军用防撞箱可配合进行箱内环氧乙烷的消毒, 保证疫区返回的安全; 配套的笔记本电脑, 掌上离心机, 干热器和加样器满足了实验进行需要的所有设备, 成为一个移动实验室; 对比其它仪器, LightCycler 移动无需校正, 可以车载移动, 实地检测而无需预先校正。系统内的电压转换器, 能够使用车内蓄电池来为仪器工作供电, 所有电源插座均为防水防雾设计。
3. **更高的安全性**, 由于细菌培养、染色和显微观察, 需要操作具有活性的病原体, 存在着威胁操作者安全和污染环境的风险, 而 PCR 技术会首先对病原体进行失活, 因此具有更高的安全性。
4. **检测灵敏度高**, 由于 PCR 对核酸的级联放大, 使十分少的样本进行 10 亿倍放大, 因此成为各种检测方法中灵敏度最高的技术, 同时结合了仪器的荧光检测, 灵敏度进一步提高。
5. **优秀的特异性**, 采用了特异的扩增引物和特异的荧光探针, 具有了比普通 PCR 双倍的特异性, 保证检测结果的准确和特异; 另外仪器提供熔解曲线分析, 进行特异鉴别。
6. **完美的重现性**, LightCycler 仪器不但能够进行有无病原体的定性检测, 还能够进行重现性不低于 99.7% 的定量结果检测, 实现病情监督。
7. **杰出的试剂系统**, LightCycler 配套有 26 种研究试剂, 22 种相关疾病诊断试剂——涉及肿瘤学、血液学、遗传疾病、转基因检测, 15 种病原微生物检测试剂, 包括 SARS 病毒、炭疽杆菌、沙门氏菌、李斯特菌、肠道菌、白色粘珠菌、铜绿假单胞菌、葡萄球菌、EB 病毒、单纯疱疹病毒、细小病毒、甲型肝炎病毒等, 配套的国产试剂包括乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、艾滋病病毒、禽流感病毒、淋球菌、沙眼衣原体、解脲支原体等。

二、实验室全自动一体化型

1) 系统组成:

1.1) 全自动组织匀浆仪—MagNA Lyser:

快速高效稳定地提取难以破碎的动植物、微生物以及其它类型样品的 DNA、RNA 和蛋白质等，短时间内彻底裂解各种样品方便进行随后的纯化步骤。



1.2) 全自动核酸分离纯化系统—MagNA compact:

世界第一品牌的核酸提取系统，使用配套的核酸抽提试剂盒，在 55 分钟内即可完成 32 个原始样品的核酸提取。全自动的核酸提取过程，避了人为操作无法杜绝的检测错误，大大提高检测结果的准确性和重复性。



1.3) 卡盘离心机— LC carousel centrifuge

1.4) 实时荧光定量 PCR—LightCycler 系统:

体积小巧，性能卓越，操作简便，扩增速度快



1.5) 分析操作软件及试剂



2) 操作流程:

阶段	步骤	所需时间
1	裂解样本 (MagNA Lyser) / (第 1 步+第 2 步)	5 分钟
2	全自动提取细菌 DNA (MagNA pure LC 自动核酸抽提系统) / (第 3 步)	55 分钟
3	快速 DNA 扩增 (Lightcycler 2.0 定量 PCR 仪+食品微生物定量 PCR 检测试剂盒) / (第 4 步)	30 分钟
4	全过程 (从第 1 步至第 4 步) 总计:	90 分钟

