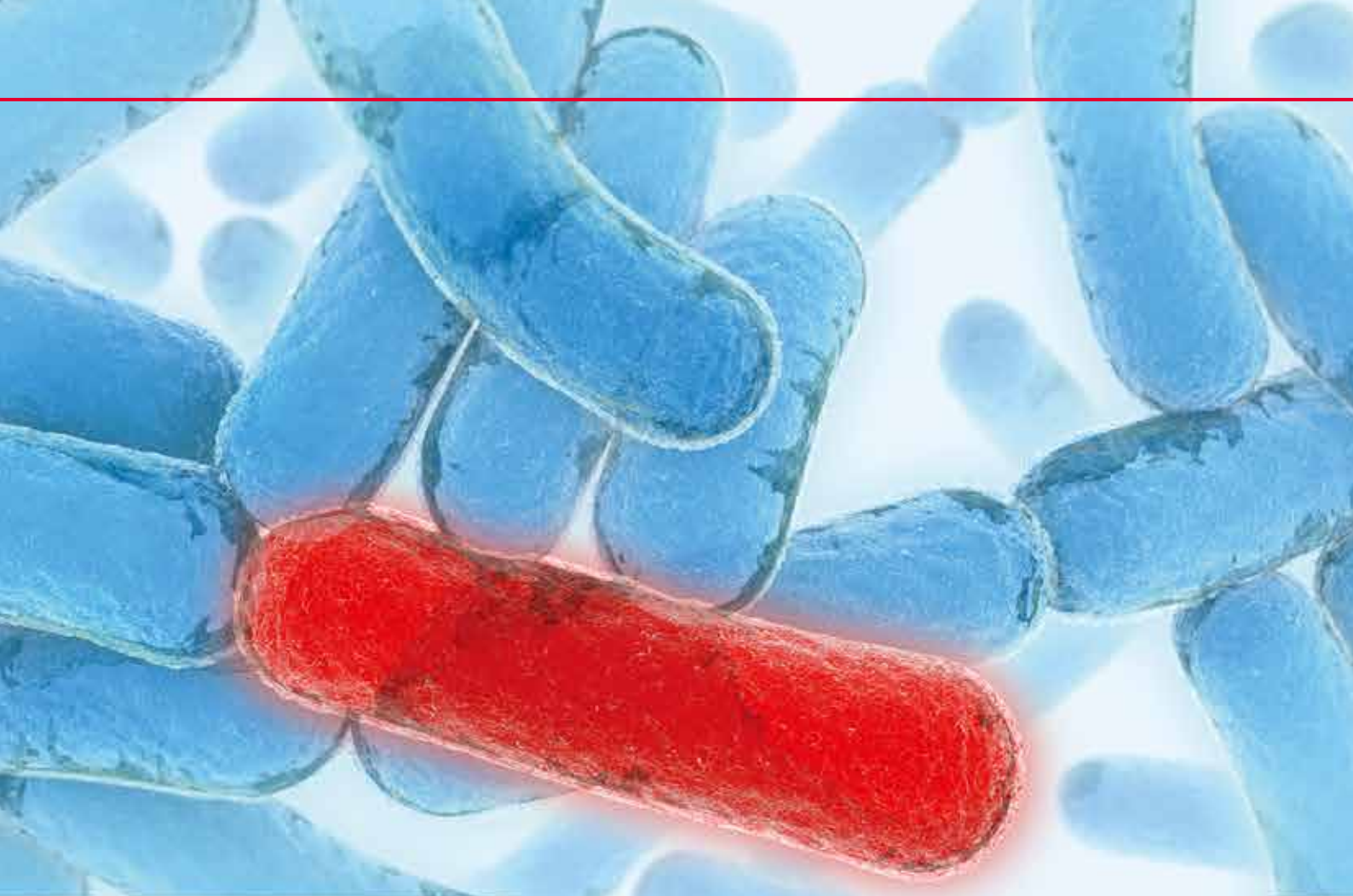


聚焦微生物研究

活菌 PCR 技术检测存活微生物





用于微生物检测的活菌 PCR 技术

传统微生物研究领域，通常通过培养的方法区分样本中的存活微生物和死亡微生物。整个过程耗费时间较长，且面临不同微生物培养的难易程度。现在，可以通过活菌 PCR 技术，使微生物研究工作者轻松、快速地实现存活微生物的特异性区分。而不再需要长时间地等待微生物的培养结果。只需用 PMA 处理您的样本，利用光化激活来掩盖死亡细胞 DNA，进行 DNA 提取并设置 PCR 运行即可。75 分钟之后，即可得到检测结果！

活菌 PCR 技术潜力巨大。此处仅为几个可从这项新技术中获益的研究领域举例：

- 工业 / 医药卫生和质量控制
- 乳制品质量控制
- 水卫生质量控制
- 消毒控制
- 食品微生物安全
- 生物医学研究

活菌 PCR 是一项可靠的区分微生物存活/死亡的技术，QIAGEN 推出的解决方案则将此技术实现了标准化，使它可以更加方便地用于广泛的相关应用。

Dr. Andreas Nocker-Einsiedler

将 PMA 应用与活菌 PCR 技术的开发者

活菌 PCR 技术工作原理

活菌 PCR 是一种创新性的技术，可用于区分活与死亡的微生物。QIAGEN 的活菌 PCR 系统采用了 DNA 嵌入剂单叠氮丙啶 PMA。PMA 是一种正在越来越多的分子生物学领域中被用于在 DNA 水平区分活与死亡微生物的化学分子。由于这种分子携带强正电荷，因此无法通过完整的存活微生物的细胞膜。不过 PMA 可以轻易地通过死亡微生物细胞的细胞膜进入细胞内。一旦进入死亡细胞，PMA 可在特定的波长下经过光化激活后通过一个锚定基团嵌入 DNA 并与其不可逆地结合（图 1）。

PMA 与死亡细胞 DNA 的不可逆结合随后抑制了后者在 PCR 中扩增，进而降低了扩增信号。此外，活细胞的 DNA 受到保护免于被 PMA 修饰，并可由 PCR 检测。这一特性使得 PMA 优于其他 DNA 嵌入染料，成为了 QIAGEN 的 BLU-V® Viability 产品系列的基础组件。

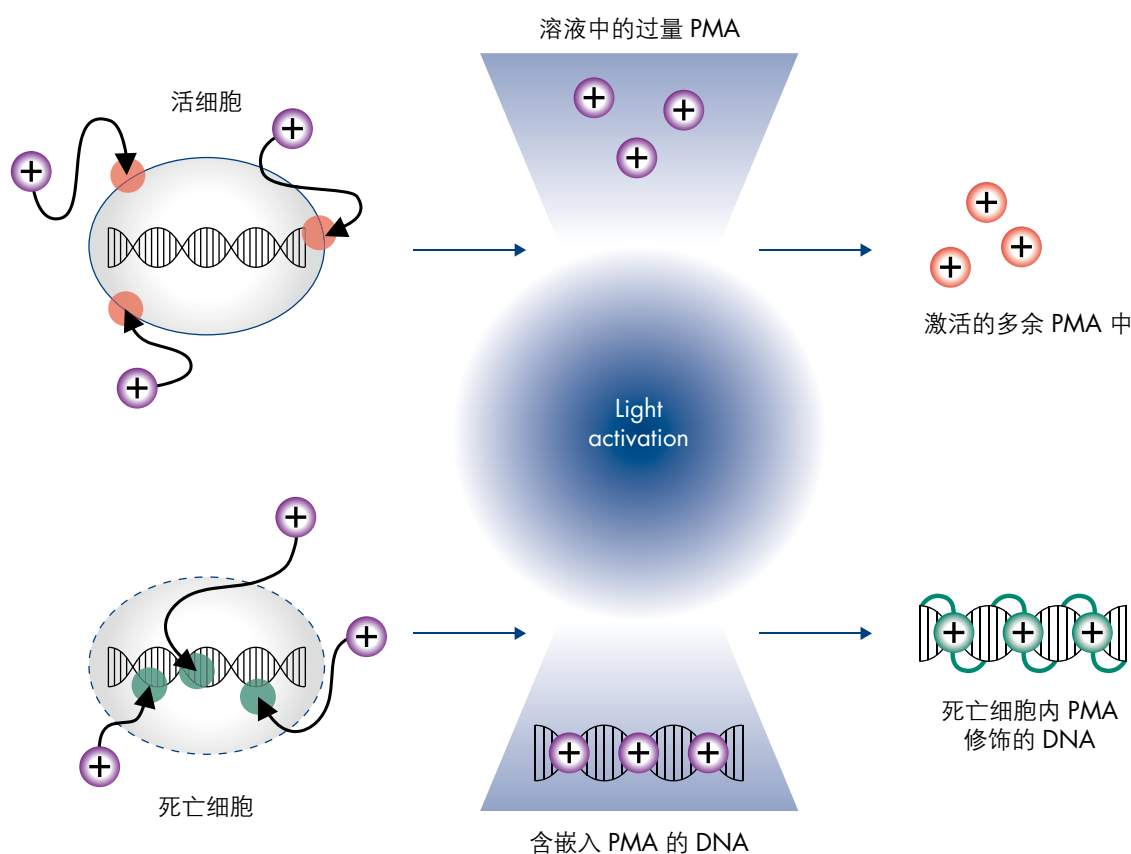


图1. 活菌 PCR 技术原理。 PMA 无法渗透活微生物的完整生物膜，因此下游 PCR 不会受到影响。相反地，PMA 可渗透死亡微生物的生物膜，随后修饰 DNA 并抑制其在下游 PCR 中的扩增。

快速、敏感且可靠地检测存活微生物

活菌 PCR 技术，可让您高效的选择性检测活微生物的 DNA，同时抑制死亡细胞中 DNA 的扩增。采用这种快速有效的方法，您无需再用传统耗时的微生物培养法就可区分活与死亡细胞。

传统 PCR 无法区分存活与死亡微生物

传统 PCR 的主要缺点之一是不能区分活与死亡微生物（图 2）。使用活菌 PCR 技术能够特异性且准确地测量存活微生物细胞内的 DNA。

活菌 PCR 选择性地抑制死亡细胞 DNA 检测

PMA 选择性地进入死亡细胞，由光激活进而嵌入 DNA 并与之共价结合，从而在后续 PCR 中强烈抑制扩增反应。由死亡细胞 DNA 获得的 C_T 信号显著高于存活 DNA，据此实现存活和死亡细胞的明确区分（图 3）。

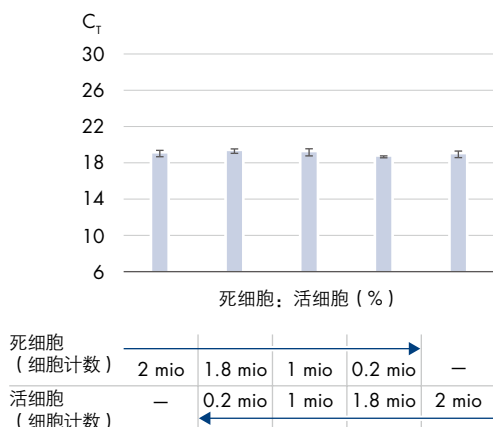


图2. 以传统 PCR 同时检测出活与死亡细胞。对来自活沙门氏菌和加热灭活沙门氏菌细胞混合物的 DNA 进行传统 PCR。对于所有细胞混合物获得的 C_T 都是相似的，证明传统 PCR 无法区分活与死亡细胞的 DNA。

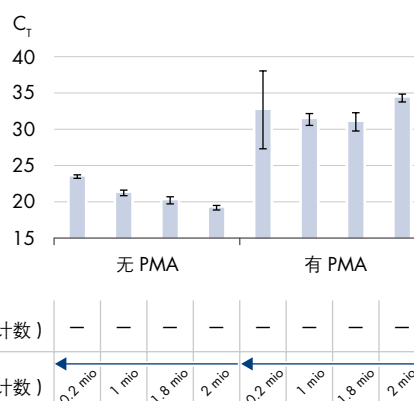


图3. PMA抑制了死亡细胞DNA的扩增。利用来自不同浓度、以 PMA 处理或未以 PMA 处理的死亡沙门氏菌细胞的 DNA 进行实时 PCR。经 PMA 处理的样本与未以 PMA 处理的样本相比，其 C_T 较高，表明 PMA 抑制了死亡沙门氏菌的 DNA 的扩增。

PMA 选择性抑制死亡细胞 DNA 的检测

当使用存活和死亡微生物的混合样本时，PMA 可选择性地抑制对死亡细胞的检测，而不会对存活细胞 DNA 的检测造成影响。样本中的死亡细胞不会影响 PMA 的性能。因此可确信，所得到的结果能够精确反映样本中的存活微生物。（图4）。

PMA 技术在混浊介质中实现高效检测

在细胞活力检测中采用光化激活化合物的主要问题之一是该化合物是否能在浑浊基质中被激活。使用 PMA 可解决这一问题，因为激活 PMA 所需的光波长可穿透这一类型的基质。在图5描述的李斯特菌检测中，提供了 PMA 在浑浊基质中的性能的验证。当在 2.5% 的浑浊巧克力酱基质中加样活李斯特菌时，PMA 处理后或未以 PMA 处理下利用 PCR 检测时无差异。不过，当以热灭活李斯特菌细胞进行相同的实验时，PMA 存在下 C_T 值显著升高，表明由于 PMA 的嵌入导致死亡李斯特菌细胞中的 DNA 扩增受到抑制（图5A）。

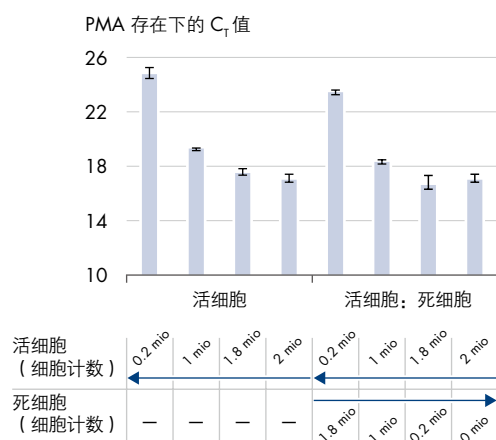


图4. 在活-死亡细胞混合物中，以 Viability PCR 可选择性检测活细胞 DNA。 对仅含活沙门氏菌细胞的样本（左栏）或活与热灭活沙门氏菌样本（右栏）进行 Viability PCR。两种样本配置的 C_T 值高度一致（偏差 < 1 计数单位），证实了 PMA 可特异性抑制死亡微生物的检测。

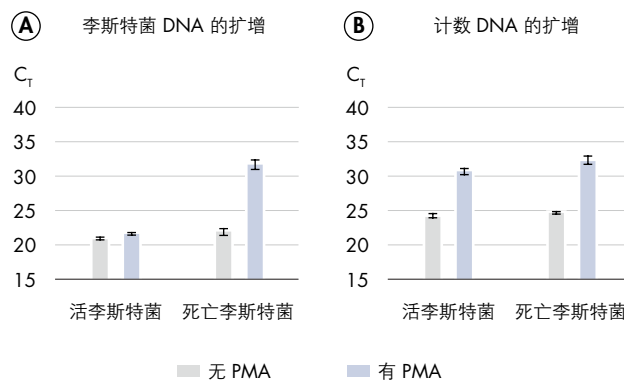


图5. 浑浊基质不会影响 PMA 区分活/死亡微生物。

A 活的或热灭活李斯特菌被加样至 2.5% 巧克力酱基质中，并分开处理。当以 PMA 处理或未以 PMA 处理时，活李斯特菌细胞的 C_T 值未显示出差异。经 PMA 处理的死亡李斯特菌细胞显示出了预期的 C_T 信号增加。**B** 质控品 DNA 被加入处于相同的 2.5% 巧克力酱基质内的活细胞或死亡细胞中。活细胞或死亡细胞的背景信号并未显著影响质控品 DNA 的检测。这些结果表明于激活 PMA 的光照强度足以穿透浑浊样本并实现成功的 DNA 嵌入。

为了确保 PMA 试剂的正确处理及其性能，同时也包含了一个质控品 DNA（点样DNA）。当在李斯特菌样本中点入质控品 DNA 时，尽管应用了浑浊基质， C_T 值出现了预期为6左右的浮动，其移动范围仍处于 6 ± 2 的区间范围内（图5B），说明该结果并未受到所使用的 Nutella® 介质影响。

综合起来考虑，在此项李斯特菌检测中获得的数据，明确证实了用于激活 PMA 的光照强度足以穿透浑浊样本并实现成功的 DNA 嵌入。

通常存在于食物和水样本中的浑浊基质不会影响采用活菌 PCR 技术的准确性和可靠性。



BLU-V 套装 — 5步骤轻松实现存活微生物检测



样本预处理

根据不同样本的特征，可进行以下预处理包括：

- 离心
- 过滤
- 稀释

PMA 孵育

样本预处理完成后，进行 PMA 孵育。具体步骤为：

- 向您的样本中添加 PMA 试剂，该试剂包含在 BLU-V Viability PMA Kit
- 在 BLU-V 孵育箱中，黑暗条件下室温孵育10分钟
- PMA 光化激活过程中无需样本加热

PMA 光化激活

随后利用 BLU-V 系统光照激活样本中的 PMA，并促进 PMA 嵌入死亡细胞 DNA 中。BLU-V 系统的特征包括：

- 以确定光波长同时对多达12 份样本进行光化激活
- 持续均一地生产光活化能量，实现最佳 PMA 激活

QIAGEN DNA
purification Kit

应用自己的分析

DNA纯化

实时荧光定量
PCR



Rotor-Gene® Q

DNA 纯化

PMA 嵌入后，可采用标准方法从样本中提取 DNA。这些操作可采用 QIAGEN 各种手动和自动化提取解决方案进行，比如：

- DNeasy® Blood & Tissue Kit
- QIAamp® UCP Pathogen Mini Kit
- QIAamp cadator® Pathogen Mini Kit

实时荧光定量 PCR

活菌 PCR 工作流程中的下一步是实时荧光定量 PCR，可采用诸如 QuantiFast® Pathogen PCR + IC Kit、QuantiNova® 探针或染料系列等 QIAGEN 实时荧光定量 PCR 试剂解决方案进行。

订购信息

产品	规格	货号
BLU-V Viability PMA Kit	PMA Reagent 2 x 0.7 mg; Buffer EB, RNase-Free Water	296015
BLU-V System	Instrument for photo-activation of dyes, includes one BLU-V Sample Holder	9002300
BLU-V Incubation Box	Box for up to 12 tubes (tube volumes up to 2 ml) for light protection during incubation	9022908
BLU-V Sample Holder	Sample holder for up to 12 tubes (tube volumes up to 2 ml)	9022909
QIAamp UCP Pathogen Mini Kit	50 QIAamp UCP Mini Columns, Collection Tubes (2 ml), Tube Extenders (20 ml), Elution Tubes, VacConnectors, Buffers, and Proteinase K	50214
QIAamp <i>cad</i> Pathogen Mini Kit (50)*	For 50 RNA/DNA preps: 50 QIAamp Mini Spin Columns, Carrier RNA, Proteinase K, Collection Tubes (2 ml), RNasefree buffers	54104
DNeasy Blood & Tissue Kit (4)*	For 4 x 96 DNA minipreps: 4 DNeasy 96 Plates, Proteinase K, Buffers, S-Blocks, AirPore Tape Sheets, Collection Microtubes (1.2 ml), Elution Microtubes RS, Caps, 96-Well Plate Registers	69581
Related Products		
Quantifast Pathogen PCR +IC Kit (100)*	For 100 x 25 µl reactions: Master Mix, lyophilized Internal Control Assay, lyophilized Internal Control DNA, ROX Dye Solution, High-ROX Dye Solution, RNase-Free Water, Nucleic Acid Dilution Buffer, Buffer TE	211352
Quantinova Probe RT-PCR Kit (100)	For 100 x 20 µl reactions: 1 ml Quantinova Probe RT-PCR Master Mix, 20 µl Quantinova Probe RT Mix, 20 µl Internal Control RNA, 500 µl Yellow Template Dilution Buffer, 250 µl ROX Reference Dye, 1.9 µl RNase-Free Water	208352

* 同时有其他试剂盒尺寸可供选择；详见公司网站www.qiagen.com。

关于最新的许可信息和产品特定的免责声明，请阅读相关的 QIAGEN 试剂盒手册或操作指南。QIAGEN 试剂盒手册和操作指南可在 www.qiagen.com 上下载，或向 QIAGEN 技术服务或当地的经销商索取。

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, BLU-V®, *cad*®, DNeasy®, Quantifast®, Quantinova®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group).
8090926 08/2016 © 2016 QIAGEN, all rights reserved.

凯杰企业管理（上海）有限公司

电话：021-3865 3865 ■ 技术支持热线：800-988-0325 400-880-0325

TechService-CN@qiagen.com ■ www.qiagen.com

The BLU-V 系统



