



TB Typing Kit VNTR-9 TB 基因分型试剂盒 VNTR-9

目录号：CW2570M (50 rxns)

保存：2-8°C 1个月，-20°C保存一年

组分说明

应用	Cat. No. Kit Size	CW2570M 50 rxns
鉴定菌株是否属于人型结核分枝杆菌	Mtb 鉴定	1 ml
DNA 模板质量鉴定	16S rRNA	1 ml
鉴定菌株是否属于北京基因型	RD105	1 ml
9 位点 VNTR 基因分型检测	QUB-11b	1 ml
	QUB-18	1 ml
	QUB-26	1 ml
	MIRU26	1 ml
	MIRU31	1 ml
	MIRU40	1 ml
	Mtub21	1 ml
	Mtub04	1 ml
	VNTR2372	1 ml
DNA 分子量标准 I	Marker I	1 ml
DNA 分子量标准 II	Marker II	400 μ l

其它相关产品 CW2571 TB 基因分型试剂盒 HV-3

产品简介

本试剂盒是以分子流行病学最新研究进展¹⁾为基础，经工艺优化后形成的人型结核分枝杆菌基因分型产品。本产品利用结核分枝杆菌基因组中可变数目串联重复序列 (variable-number tandem repeats, VNTR) 多态性进行基因型分区临床菌株，是研究结核分枝杆菌分子流行病学和监测结核病传播状况的有力工具。与现有其它基于VNTR原理的结核分枝杆菌VNTR分型系统相比，这一分型系统对中国流行的菌株具有更强的分辨能力^{1, 2, 3)}，因此特别适合于中国用户的需求。

通过对各PCR反应引物序列和预混反应液成份进行精心优化，使得本产品具有很强的抗干扰力。与用户自配试剂相比，本产品显著提升了特异条带信号强度，降低了使用粗制模板（煮沸菌液）时非特异条带的出现率，使实验操作更加简便、快捷的同时，提高了检测成功率。本产品的预混反应液化学稳定性良好，能有效抵抗反复冻融（10次）和较长时间（一周）的室温环境，更好地适应了用户检测工作中的灵活性需求。

本产品将人型结核分枝杆菌（MTBC）鉴定、非结核分枝杆菌（MOTT）及模板质量鉴定、结核分枝杆菌北京家族菌株鉴定，和后续的9位点VNTR分型鉴定整合在一个试剂盒中，使用户仅需一个试剂盒、12个PCR反应即可获得待测菌株基因型鉴定所需的完整信息。检测的分辨力指数（Hunter-Gaston index, HGI）可达0.989¹⁾。并且，基因型鉴定结果可数字

化记录,使得不同批次样本,不同地区,不同时间,不同研究者之间的实验数据可以很方便地进行比对和汇集分析,极大地提高了数据的使用效率。

对鉴定为VNTR-9基因型成簇(所有9个位点具有相同重复数)的样本,若要判定菌株间是否存在近期传播关系,需使用配套产品TB基因分型试剂盒HV-3(货号CW2571),做进一步的分型鉴定。VNTR-9与HV-3两个产品的结合使用可将检测的HG提升³¹至0.993¹。关于TB基因分型试剂盒HV-3(货号CW2571)产品的更多信息请见其产品说明书。

参考文献

- 1) Luo T et al. Development of a hierarchical variable-number tandem repeat typing scheme for Mycobacterium tuberculosis in China. PLoS One. 2014 Feb 25;9(2)
- 2) Sun G et al. Discriminatory potential of a novel set of Variable Number of Tandem Repeats for genotyping Mycobacterium marinum. Vet Microbiol. 2011 Aug 26;152(1-2)
- 3) Zhang L et al. Highly polymorphic variable-number tandem repeats loci for differentiating Beijing genotype strains of Mycobacterium tuberculosis in Shanghai, China. FEMS Microbiol Lett. 2008 May;282(1):22-31.

注意事项

1. 为避免污染,建议制备样本和配制 PCR Mix 在不同的地点内进行,并使用不同的移液器。
2. 在样本 DNA 的收集,抽提和扩增的所有环节都应注意作好标记,同时防止不同样本间发生交叉污染。
3. 常用试剂和耗材在实验前需高压灭菌。
4. 每管 PCR Mix 中均含有不同的引物,不可混用。可根据实验需求一次性分装为不同的量,避免反复冻融。
5. 为避免打开反应管时,反应液飞溅,开盖前请短暂离心,收集液体于管底。若不小心溅到手套或桌面上,应立即更换手套并用75%酒精或稀酸擦拭桌面。
6. 吸取时注意不要交叉污染 PCR Mix,建议每次取 Mix 前用75%酒精擦拭移液器头2次。
7. 实验前准备:1×TE 缓冲液(PH=8.0)、0.5×TBE 缓冲液、琼脂糖、溴化乙锭(EB)、普通 PCR 仪、DNA 电泳设备和凝胶成像仪、0.2 ml PCR 反应管、八联排或96孔 PCR 管、不同规格的移液器:0.5-10 μl 和 20-200 μl。

操作步骤

1. DNA 模板制备:

1.1 从固体培养基上刮取少量(1-2接种环)样本,重悬于100 μl TE 中,80°C 灭活30分钟。

1.2 灭活后的菌株拿出 P3 实验室进行如下操作:

100°C 煮沸10分钟(煮沸时 EP 管盖子可能会爆开,要尽量避免,扣紧 EP 管,不要让水进入管中),立即置于冰上2分钟,12,000 rpm (~13,400×g)离心10分钟后,取上清置于另一无菌 EP 管中,做上标记,-20°C 保存。

2. 检测程序:

2.1 取出 TB 基因分型试剂盒 VNTR-9,待液体平衡到室温后,轻微摇晃 3-4 次混匀,12,000 rpm 离心 5 秒,使盖上的液体收集到管内。

2.2 结核分枝杆菌基因型分析:

2.2.1 鉴定样本是否为人型结核分枝杆菌(重要!此步骤不可省略!):

A. PCR 扩增:反应体系为 20 μl。

在每个 PCR 管中分别加入 19 μl Mtb 鉴定 PCR Mix,1 μl DNA 模板,混匀。

B. 反应程序：

步骤	温度	时间	
预变性	95°C	10 min	
变性	94°C	30 s	} 30个循环
退火	60°C	30 s	
延伸	72°C	30 s	
终延伸	72°C	7 min	

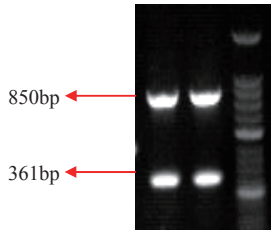
C. 制胶，电泳

使用 1% 的琼脂糖凝胶对 PCR 扩增产物进行电泳。

配制 1% 的琼脂糖凝胶，12×6 cm 胶盘制胶，每块胶为 40 ml。

- 1) 称取 0.4 g 琼脂糖，加入 40 ml 0.5×TBE，在天平上称重后放入微波炉，高火加热 2-3 分钟，使琼脂糖完全溶化，摇匀，观察为均一透明溶液，无颗粒，再在天平称量，补入适量的双蒸水，以保持胶凝胶的浓度不受影响。
- 2) 待融化的凝胶冷却至 55°C 左右时加入 2 μl 溴化乙锭 (10 ug/ml)，轻轻旋转以充分混匀。用 18 齿的梳子制胶，将温热的凝胶浇灌入胶盘。
- 3) 待凝胶完全凝结 (室温下放置 30 分钟)，小心拔出梳子，取出托盘，放入电泳槽中。电泳槽中加入 0.5×TBE 缓冲液，没过胶面 1-2 mm。
- 4) PCR 产物上样：每个孔中加入 3 μl PCR 产物，每块胶上留一个孔加入 5 μl Marker I，每块胶上加一个 H37Rv 作为质量控制。电压 150V，电泳时间为 45 分钟。

结果显示：



D. 结果分析：

- 1) 如果出现了 850 和 361 bp 两条带，则说明模板 DNA 是人型结核分枝杆菌，可进入第 F 步 (见后面) 进行结核分枝杆菌北京基因型的分析鉴定，并进一步使用本试剂盒对该菌株进行 9 位点 VNTR 基因型分析鉴定。
- 2) 如果只扩增出 850 bp 的条带，则说明该菌株属于结核分枝杆菌复合群，但不是人型结核分枝杆菌，不适用本产品进行基因型分析鉴定。
- 4) 如果没有特异性条带扩增，则说明该菌株是非结核分枝杆菌或模板 DNA 质量不好，不适用本产品进行基因型分析鉴定，可放弃该样本，或进入第 E 步 (见后面)，检测 DNA 模板的质量。

E. DNA 模板质量鉴定：

若在以上步骤 A-D 中没有特异性条带扩增，则说明模板 DNA 质量不佳或该菌株并非结核分枝杆菌，出现此种情况请进行如下操作。

- 1) PCR 扩增：反应体系为 20 μl。

在每个 PCR 管中分别加入 19 μl 16S rRNA PCR Mix，1 μl DNA 模板，混匀。

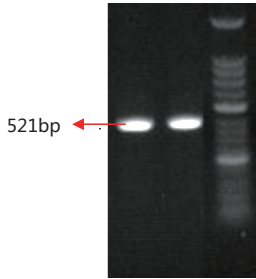
2) 反应程序：

步骤	温度	时间	
预变性	95°C	10 min	
变性	94°C	30 s	} 30 个循环
退火	55°C	30 s	
延伸	72°C	30 s	
终延伸	72°C	7 min	

3) 电泳

1%琼脂糖凝胶电泳，150V 电泳 45 分钟；

4) 结果显示：



5) 结果分析：

所有细菌中都存在 16S rRNA 序列，如果样本无扩增产物，说明模板 DNA 的数量或质量不足以进行 VNTR 基因分型检测。如果有扩增产物条带出现，则说明此菌株为非结核分枝杆菌，不应使用本试剂盒进行基因分型鉴定。

F. 北京基因型菌株鉴定方法：

在确定菌株为结核分枝杆菌后，进一步区分是否属于北京基因型菌株。

1) PCR 扩增：反应体系为 20 μ l。

在每个 PCR 管中分别加入 19 μ l RD105 PCR Mix ， 1 μ l DNA 模板，混匀。

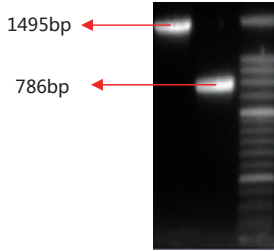
2) 反应程序：

步骤	温度	时间	
预变性	95°C	10 min	
变性	94°C	30 s	} 30 个循环
退火	68°C	30 s	
延伸	72°C	3 min	
终延伸	72°C	7 min	

3) 电泳

1%琼脂糖凝胶电泳，150V 电泳 45 分钟。

4) 结果显示：



5) 结果分析：

如果扩增产物为 1495 bp，该菌株为非北京基因型菌株；

如果扩增产物为 786 bp，该菌株为北京基因型菌株。

2.2.2 结核分枝杆菌 9 位点 VNTR 基因型分型法：对结核分枝杆菌临床菌株进行基因型分析，初步鉴定成簇菌株。

A. PCR 扩增：反应体系为 20 μ l。

取 9 个 PCR 反应管，在每个 PCR 管中分别加入 19 μ l QUB-11b, QUB-18, QUB-26, MIRU26, MIRU31, MIRU40, Mtub21, Mtub04, VNTR2372 的 PCR Mix，加入 1 μ l DNA 模板，混匀。

B. 反应程序：

步骤	温度	时间	} 30 个循环
预变性	95 $^{\circ}$ C	10 min	
变性	94 $^{\circ}$ C	30 s	
退火	58 $^{\circ}$ C	30 s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	30 s	
终延伸	72 $^{\circ}$ C	7 min	

C. 制胶、电泳：

C-1：注意事项：

重要！每次实验需要设置阳性（H37Rv 菌株 DNA）和阴性对照（去离子水）。

关键！本实验是以琼脂糖凝胶电泳为基础来判读 VNTR 位点基因型，因此，为了使不同实验室结果能准确的相互比较，在电泳这一步必须要按照统一的标准操作，应注意以下几点：

- 1) 制胶所用梳子为 18 孔。
- 2) 凝胶左右边上的两个孔由于在电泳过程中容易使条带变形，影响结果判读，舍弃不用，或者在其中一个孔点上阴性对照，剩余 16 孔分为 12 个样本，3 个 DNA Marker 和 1 个阳性对照。点样顺序分别为“1, 2, M, 3, 4, 5, 6, M, 7, 8, 9, 10, M, 11, 12, H37Rv”，数字代表样本，M 代表 DNA Marker。
- 3) PCR 扩增产物进行首次电泳并使用 Marker I 时，凝胶浓度为 1%，应使用两电极间距离不小于 30 厘米的电泳槽，电压为 150V，时间为 100-120 分钟。
- 4) 如果扩增产物片段过大（>1000bp），需要再次电泳并使用 Marker II 时，凝胶浓度为 0.8%，应使用两电极间距离不小于 30 厘米的电泳槽，电压 150V，时间为 150 分钟。

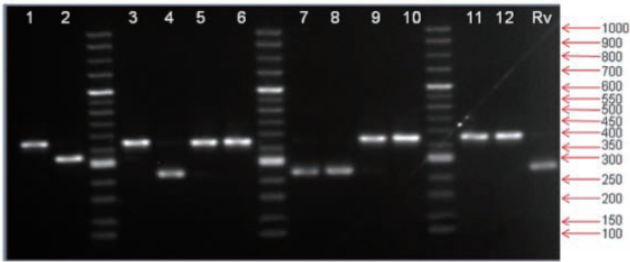
C-2: 制胶以及电泳过程:

使用 1% 的琼脂糖凝胶对 PCR 扩增产物进行电泳。

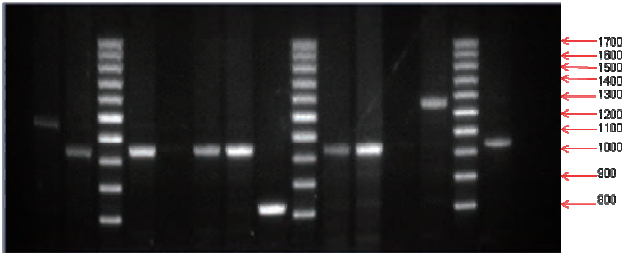
配制 1% 的琼脂糖凝胶, 12×12 cm 胶盘制胶, 每块胶为 80 ml。

- 1) 称取 0.8 g 琼脂糖, 加入 80 ml 0.5×TBE, 在天平上称重后放入微波炉, 高火加热 2-3 分钟, 使琼脂糖完全溶化, 摇匀, 观察为均一透明溶液, 无颗粒, 再在天平称量, 补入适量的双蒸水, 以保持胶的浓度不受影响。
- 2) 待融化的凝胶冷却至 55°C 左右时加入 4 μl 溴化乙锭 (10 ug/ml), 轻轻旋转以充分混匀。用 18 齿的梳子制胶, 将温热的凝胶浇灌入 12×12 cm 胶盘。
- 3) 待凝胶完全凝结 (室温下放置 40 分钟), 小心拔出梳子, 取出托盘, 放入电泳槽中。电泳槽中加入 0.5×TBE 缓冲液, 没过胶面 1-2 mm。
- 4) 上样电泳: 每块胶中加入 12 个样本 (最边上的孔不加样), 每个孔中加入 3-5 μl PCR 产物, 同时每块胶上加三个 5 μl DNA Marker I, 加一个 H37Rv 作为质量控制 (点样孔分布见下图)。电压 150V, 电泳时间为 100-120 分钟。本步骤是各位点最终读数是否准确的关键, 需要统一按照此标准操作。
- 5) 部分位点 (QUB-18 及 QUB-26) 在临床菌株中存在扩增产物大于 1000 bp 的情况, 对这些扩增产物再利用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳, 同时加入 DNA Marker II 作为条带大小对照, 电压 150V, 电泳时间 150 分钟。

Marker I



Marker II



D. 结果分析:

根据各临床菌株扩增条带与 Marker 相对位置, 利用凝胶分析软件读出每个条带的大小。利用各 VNTR 位点重复单元读数表及 VNTR 位点读数规则, 计算出各菌株在该位点的重复单元数, 每个 VNTR 位点重复单元读数表及 VNTR 位点读数规则附后。

结果报告：Excel 文件（以下表格为结果报告输出格式举例）

菌株编号	地区	年份	结核分枝杆菌	北京基因型	9 位点 VNTR 结果								
					QUB	QUB	MIRU	QUB	Mtub	MIRU	Mtub	MIRU	VNTR
					-11b	-18	26	-26	21	31	04	40	2372
1	SH	2007	Y	N	0	1	2	1	1	1	0	3	2
2	SH	2007	Y	N	0	1	6	4	1	1	0	3	2
3	SH	2007	Y	Y	5	9	8	9	5	1	0	3	2
4	SH	2007	Y	Y	5	9	8	9	5	2	3	3	5
5	SH	2006	Y	Y	5	9	8	9	5	2	3	2	5
6	SH	2007	Y	Y	5	9	8	9	5	2	3	2	5
7	SH	2007	Y	Y	6	9	8	9	5	2	3	2	5

比较不同菌株 9 个 VNTR 位点的重复数，进行成簇分析：如果两个或两个以上菌株具有相同 9 位点基因型，则初步鉴定为成簇菌株，如有必要，可使用配套产品，CW2571，TB 基因分型试剂盒 HV-3，做更精细的进一步分型鉴定。如果分离的菌株具有特异的 9 位点基因型，则鉴定为单一菌株。

附录 1：VNTR 位点读数规则

VNTR 位点	侧翼序列	重复单	扩增片段长度 (bp, 以MTB H ₃₇ Rv为例) = 重复单元长度 (bp) × 重复单元个数 + 不完整重复序列 (bp) + 侧翼序列长度 (bp)
	大小 (bp)	元大小 (bp)	
QUB-11b	67	69	422=69×5+10+67
QUB-18	182	78	621=78×5+49+182
QUB-26	129	111	708=111×5+24+129
MIRU26	243	48	387=48×3+0+243
MIRU31	108	52	264=52×3+0+108
MIRU40	354	54	408=54×14+0+354
Mtub21	92	57	206=57×2+0+92
Mtub04	137	51	269=51×2+30+137
VNTR2372	172	57	298=57×2+12+172

附录 2 : VNTR 位点重复单元读数表

1		2		3		4	
QUB-11b		QUB-18		QUB-26		MIRU26	
repeats	片段大小	repeats	片段大小	repeats	片段大小	repeats	片段大小
1	146	0	231	1	264	1	291
2	215	1	309	2	375	2	339
3	284	2	387	3	486	3	387
4	353	3	465	4	597	4	435
5	422	4	543	5	708	5	483
6	491	5	621	6	819	6	531
7	560	6	699	7	930	7	579
8	629	7	777	8	1041	8	627
9	698	8	855	9	1152	9	675
10	767	9	933	10	1263	10	723
		10	1011	11	1374		
		11	1089	12	1485		
		12	1167				
注：QUB-11b 重复单元大小为 69bp。 H37Rv：67+69× 5+10=422bp		注：QUB-18 重复单元大小为 78bp，大多数临床菌株有一个 49bp 大小的不完整重复。 H37Rv：182+78× 5+49 =621bp		注：QUB-26 重复单元大小为 111bp，部分临床菌株有一个 24bp 大小的不完整重复。 H37Rv：129+111× 5+24=708bp		注：MIRU26 位点重复单元大小为 48bp。 H37Rv：243+48× 3=387bp	

5		6		7		8		9	
MIRU31		MIRU40		Mtub21		Mtub04		VNTR2372	
repeats	片段大小	repeats	片段大小	repeats	片段大小	repeats	片段大小	repeats	片段大小
1	160	1	408	1	149	0	167	1	241
2	212	2	462	2	206	1	218	2	298
3	264	3	516	3	263	2	269	3	355
4	316	4	570	4	320	3	320	4	412
5	368	5	624	5	377	4	371	5	469
6	420	6	678	6	434	5	422	6	526
7	472	7	732	7	491	6	473	7	583
8	524	8	786	8	548	7	524	8	640
9	576			9	605	8	575	9	697
10	628			10	662			10	754
注：MIRU31 重复单元大小为 52bp，部分临床菌株有一个 24bp 大小的不完整重复。 H37Rv：108+52× 3+24=264bp		注：MIRU40 重复单元大小为 54bp。 H37Rv：354+54× 1=408bp		注：Mtub21 重复单元大小为 57bp。 H37Rv：92+57× 2=206bp		注：Mtub04 重复单元大小为 51bp，部分临床菌株有一个 30bp 大小的不完整重复。 H37Rv：137+51× 2+30=269bp		注：VNTR2372 重复单元大小为 57bp，部分临床菌株有一个 12bp 大小的不完整重复。 H37Rv：172+57× 2+12=298bp	

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其他用途