



## TB Typing Kit HV-3 TB 基因分型试剂盒 HV-3

目录号：CW2571M ( 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	CW2571M 50 rxns
高分辨3位点VNTR检测	VNTR3820	1 ml
	VNTR4120	1 ml
	VNTR3232	1 ml
DNA 分子量标准 I	Marker I	300 $\mu$ l
DNA 分子量标准 II	Marker II	250 $\mu$ l

其它相关产品 CW2570 TB 基因分型试剂盒 VNTR-9

## 产品简介

本试剂盒是以分子流行病学最新研究进展<sup>1)</sup>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型区分临床菌株,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<sup>1, 2, 3)</sup>,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。

本试剂盒是TB基因分型试剂盒VNTR-9(货号CW2570)的配套产品。对VNTR-9试剂盒鉴定为成簇或相同菌株的样本,如有必要,可使用本产品做更精细的进一步分型鉴定。本产品中的3个高分辨率检测位点VNTR3820, VNTR4120和VNTR3232与VNTR-9中的9个检测位点结合使用可将检测的分辨率指数(Hunter-Gaston index, HGI)提升至0.993<sup>1)</sup>。

## 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. 本产品是 TB 基因分型试剂盒 VNTR-9 ( 货号 CW2570 ) 的配套产品。待测菌株应先经过 VNTR-9 分型检测, 再使用本产品检测。且本产品的检测结果应与 VNTR-9 的检测结果进行整合分析。
2. 为避免污染, 建议制备生物时与配制 PCR Mix 在不同的地点内进行, 并使用不同的移液器。
3. 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。
4. 常用试剂和耗材在实验前需高压灭菌。
5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. 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  $\mu$ l 和 20-200  $\mu$ l。

## 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  $\mu$ l 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(煮沸时注意避免 EP 管盖子爆开, 避免让水进入管中), 立即置于冰上 2 分钟, 12,000 rpm (~13,400×g)离心 10 分钟, 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 HV-3, 待液体平衡到室温后, 轻微摇晃 3-4 次混匀, 然后 12,000 rpm (~13,400×g)离心 5 秒, 使盖上的液体回落到管内。
  - 2.2 三位点 VNTR 分型: 对于 12 位点结果相同的菌株需进一步进行 VNTR 分型, 即增加以下 4 个位点进行比较。
- 1) PCR 扩增: 反应体系为 20  $\mu$ l。

在每个 PCR 管里分别加入 19  $\mu$ l VNTR3820、VNTR4120、VNTR3232 的 PCR Mix, 加入 1  $\mu$ l DNA 模板, 混匀。

2) 扩增条件：

a. VNTR3820：

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	58°C	30 s	
延伸	72°C	90 s	
终延伸	72°C	7 min	

b. VNTR3232、VNTR4120：

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	64°C	30 s	
延伸	72°C	90 s	
终延伸	72°C	7 min	

3) 制胶、电泳：

a：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，为了使结果准确，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：

a-1：制胶所用梳子为 18 孔。

a-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。

a-3：PCR 扩增产物进行首次电泳并使用 Marker I 时，凝胶浓度为 1%，电压为 150V，时间为 100-120 分钟。

a-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%，电压 150V，时间为 150 分钟。

b：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。

b-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。

b-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。

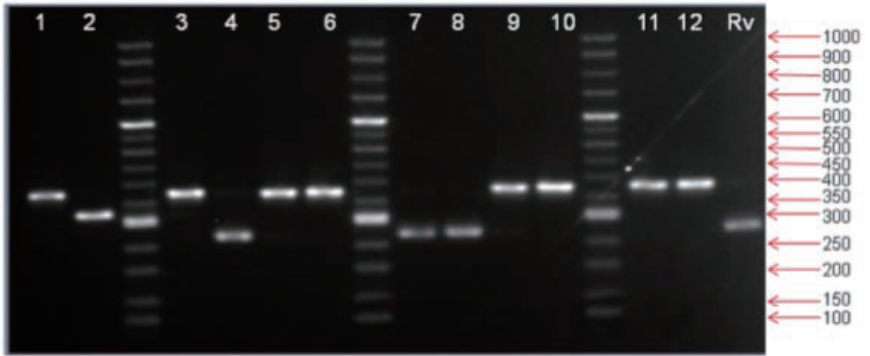
b-3：待凝胶完全凝结（室温下放置 40 分钟），小心拔出梳子，取出托盘，放入电泳槽中。电泳槽中加入 0.5×TBE 缓冲液，没过胶面 1-2 mm。

b-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。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。

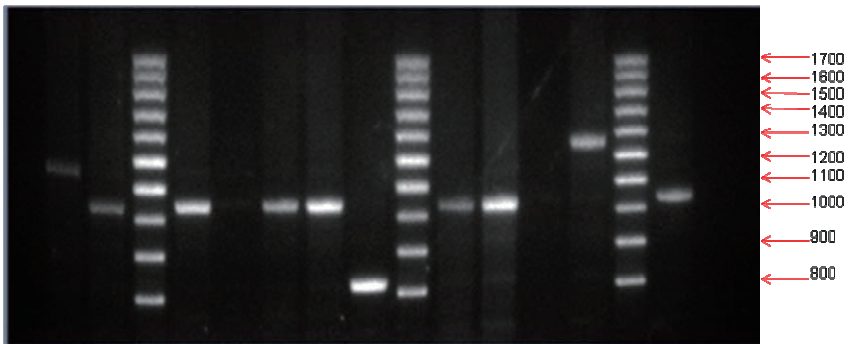
b-5：部分位点在临床菌株中存在扩增产物大于 1000 bp 的情况，对这些扩增产物再利用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳，同时加入 DNA Marker II 作为条带大小对照，电压 150V，电泳时间 150 分钟。

4) 结果显示：

**Marker I**



**Marker II**



5) 结果分析：

- a. 如果不同菌株的 3 个高变位点基因型也相同，可确定为成簇菌株；
- b. 如果高变位点读数高度相似，即只有 1-2 个高变位点有差别，需结合流行病学数据鉴定是否为成簇菌株；
- c. 如果 3 个高变位点基因型都不一致，鉴定为单一菌株。

附录 1 : VNTR 位点读数规则

VNTR 位点	侧翼序列长度 (bp)	重复单元长度 (bp)	扩增片段长度 (bp, 以MTB H <sub>37</sub> 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)
VNTR3820	247	57	444=57×3+26+247
VNTR4120	310	57	447=57×2+23+310
VNTR3232	191	56	407=56×3+48+191

附录 2 : VNTR 位点重复单元读数表

10		11		12	
VNTR3820		VNTR4120		VNTR3232	
repeats	片段大小	repeats	片段大小	repeats	片段大小
1	330	0	333	1	295
2	387	1	390	2	351
3	444	2	447	3	407
4	501	3	504	4	463
5	558	4	561	5	519
6	615	5	618	6	575
7	672	6	675	7	631
8	729	7	732	8	687
9	786	8	789	9	743
10	843	9	846	10	799
11	900	10	903	11	855
12	957	11	960	12	911
13	1014	12	1017	13	967
14	1071	13	1074	14	1023
15	1128	14	1131	15	1079
16	1185	15	1188	16	1135
17	1242				
18	1299				
注: VNTR3820 重复单元大小为 57bp。 H37Rv : 247+57×3+26=444bp		注: VNTR4120 重复单元大小为 57bp。 H37Rv : 310+57×2+23=447bp		注: VNTR3232 重复单元大小为 56bp。 H37Rv : 191+56×3+48=407bp	

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途