

Code No. RR027

研究用

TaKaRa

TaKaRa *Bacillus anthracis*
PCR Detection Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒外必备试剂与仪器	1
● 使用前的注意事项	2
● 操作注意事项	2
● 试剂盒原理	2
● 操作步骤	3
● 结果判定	5
● 实验例	6
● 补充：关于区域划分	6
● 参考文献	7

● 制品说明

炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) 为好氧性革兰氏阳性芽孢杆菌(1–2 × 5–10 μm)，其病原性来源于菌体中的两种毒性质粒 (pX01, pX02)。pX01 质粒上有三种毒素成分 (PA: Protective antigen; LF: Lethal factor; EF: Edema factor)；pX02 质粒编码了荚膜合成相关基因 (*capA*, *capB*, *capC*)。当菌体中同时具有这两种毒性质粒时，菌体便显示病原性。

PCR 技术以少量 DNA 为模板，在短时间内可快速扩增目的基因，每个循环过程包含三个步骤：热变性、引物退火、DNA 聚合酶作用下的延伸，短时间内可使目的基因指数倍扩增。

本制品是利用 PCR 技术快速检测和琼脂糖电泳检测 pX01 质粒上的 PA 基因和 pX02 质粒上的 *capA* 基因的试剂盒。可以在同一反应中同时检测上述两种基因。

本试剂盒使用高效的 *TaKaRa Ex Taq*[®] Hot Start Version (Code No. RR006)，在热变性阶段可有效地避免引物自连或引物二聚体等非特异性扩增，达到高效扩增目的基因的效果。由于在反应体系中设定了内参照，可以防止假阴性结果的出现。

本试剂盒研发的成功需要感谢Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine的Dr. Sou-ichi Makino的大力协作。

● 制品内容 (48 次量)

<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/μl)	12.5 μl
5 × Reaction Mixture* ¹	500 μl
PA Primers (PA6, PA7) (各 10 μM)	200 μl
CAP Primers (M011, M012) (各 10 μM)	200 μl
100 bp DNA Ladder (650 ng/5 μl)	50 μl
6 × Loading Buffer* ²	60 μl

*1: 内含 dNTP Mixture, Internal Control 等。

*2: 36% Glycerol, 30 mM EDTA, 0.05% Bromophenol Blue, 0.035% Xylene Cyanol。

【各种引物序列】

引物名称		各引物序列
PA Primers	PA7 Primer	5' -ATCAC CAGAG GCAAG ACACC C-3'
	PA6 Primer	5' -ACCAA TATCA AAGAA CGACG C-3'
CAP Primers	M011 Primer	5' -GACGG ATTAT GGTGC TAAG-3'
	M012 Primer	5' -GCACT GGCAA CTGGT TTTG-3'

【炭疽菌 DNA 及 Internal Control DNA 扩增的片段大小区别】

DNA 种类	PA Primers	CAP Primers
炭疽菌 DNA	211 bp	591 bp
Internal Control DNA	409 bp	98 bp

● 保存: -20°C

● 试剂盒外必备试剂与仪器

[试剂]

1. 灭菌水
2. PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A)
3. 电泳 Buffer
TBE (Tris-borate-EDTA) Powder (Code No. T905) 等

4. DNA 染料
SYBR[®] Green I Nucleic Acid Gel Stain (Code No. 5760A/5761A)

[仪器]

1. PCR 扩增仪
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (Code No. TP600)
2. 电泳设备
3. 电源
4. 紫外透射装置 (波长 300 nm)
5. 宝丽来相机或数字凝胶成像系统用于染色胶成像
6. 加热模块 (可使用温度 95°C)
7. 低温离心机 (可放置 1.5 ml 离心管)

[其他]

1. 0.2 ml PCR 管
2. 微型移液枪
3. 与移液枪配套枪头(带滤膜)
4. 琼脂糖凝胶染色托盘

● 使用前的注意事项

· 由于本试剂盒是基因检测试剂盒, 不仅能够以活菌为检出对象, 同时也可以检测死菌。另外, 设计的 Primer 序列内发生基因变异、缺失/或插入时, 可能会出现无法检出的情况。

(关于检测结果判定时产生的相关问题, Takara Bio 不承担任何责任。)

· 判断为阳性的样品, 要用微生物学方法 (如革兰氏染色等) 进行再确认。

● 操作注意事项

使用 PCR 仪时请按照仪器说明书进行操作。

- 1) 如果引物受到核酸酶污染, 就无法进行分析。汗液或唾液中都含有核酸酶, 操作过程要戴口罩和手套。
- 2) PCR 反应是非常极其灵敏的, 为了避免污染, 建议从反应液配制到检测按照下面 4 个区域进行分区操作, 操作区进行物理性隔离。为防止污染, 除在操作区 4 外请避免对 PCR 扩增产物 tube 进行开闭。
 - 操作区 1: 反应液的配制及分装。
 - 操作区 2: 检测样品的制备 (DNA 提取等)。
 - 操作区 3: 将检测样品添加到反应液中。
 - 操作区 4: 电泳等检测 PCR 扩增产物。

● 试剂盒原理

PCR 方法 (Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链式反应)

PCR 技术是一种体外快速扩增特定 DNA 片段的方法, 由 DNA 链的热变性 (denaturation step)、引物退火 (annealing step)、延伸 (extension step) 组成一轮循环, 每一轮循环扩增的产物再作为下一轮的反应模板, 反复进行变性, 退火和聚合反应循环 (参照下图) 在短时间内 DNA 扩增能达到 100 万倍。

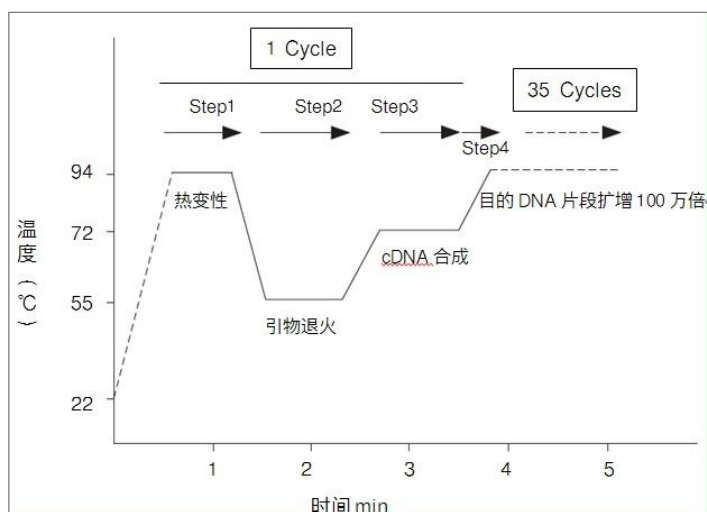


图 1 PCR 扩增 DNA 的过程原理

步骤 1: 在 PCR 反应液中(含有引物、dNTP、聚合酶等), 双链 DNA 解旋。

步骤 2: 引物退火获得单链 DNA

步骤 3: DNA 聚合酶参与下的 DNA 合成。

步骤 4: 重复步骤 1, 开始新的循环。

每个循环包括上述 1-4 个步骤, 共进行 35 个循环。

● 操作步骤

1. 样品制备 (在操作区 2 进行)

[从液体培养基中获得菌体 DNA]

1) 取 10 μl 菌液加入到 100 μl 灭菌水中, 95°C 加热 15 min.。

2) 离心, 上清液保留, 直接取 1 μl 上清液进行 PCR。

[从平板上获得菌体 DNA]

1) 无菌接种环取少量单菌落, 置于 100 μl 灭菌水中, 混匀。

2) 95°C 加热 15 min.。

3) 离心, 上清液保留, 取 1 μl 上清液用于 PCR 反应。

[从粉末样品中获取菌体 DNA]

1) 取少量样品粉末溶于 1 ml 灭菌水中。

2) 离心后, 向沉淀中加入 1 ml 灭菌水清洗一次。

3) 再次离心, 将菌体悬浮在 1 ml 灭菌水中。

4) 95°C 加热 15 min.。

5) 离心, 取 1 μl 上清液用于 PCR 反应。

注意: 样品中可能包含致病性微生物, 操作时要格外小心, 实验结束时所有使用的器皿、仪器、废弃物等均应该按照相关规定进行无害化处理。当 PCR 检测结果判定为阳性时, 需要进行生化实验进行确认。

2. PCR

1) 准备下列试剂配制反应液, 分装到 0.2 ml microtube 中 (在操作区 1 进行)

准备除模板外的预混液 (如模板数 + α 份), 每个反应管中分装 49 μl , 并轻轻盖上盖子。

对于阴性对照, 加入 1 μl 灭菌水并盖紧管盖。

试剂	体积	终浓度
5 × Reaction Mixture	10 μl	1X
CAP Primers (10 μM)	4 μl	0.8 μM each
PA Primers (10 μM)	4 μl	0.8 μM each
Template*	1 μl	
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/μl)	0.25 μl	0.025 U/μl
灭菌水	30.75 μl	
Total	50 μl	

*设置阴性对照时，以灭菌水代替模板。

2) 添加检测样品 (Template) (在操作区 3 进行)

除阴性对照外，将检测样品或阳性对照添加到每个管中，并盖紧瓶盖。用桌面离心机将反应管轻轻离心，然后放置于 PCR 仪中。

【PCR 反应条件】

95°C	2 min	} 35 cycles
95°C	15 sec	
60°C	15 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	

PCR 反应后取 5–10 μl 进行电泳，反应产物置于 4°C 或 -20°C 保存。

3. 琼脂糖凝胶的准备

- 1) 在三角瓶中加入电泳用 buffer，缓慢加入 PrimeGel Agarose PCR-Sieve 至浓度为 3% (w/v)，边搅拌边加入。
- 2) 微波炉加热 2–3 min. 取出搅拌均匀确认溶液溶解均匀，重复加热搅拌直到溶解均匀。
- 3) 准备胶板，插上梳子。
- 4) 待凝胶冷却到 (50–60°C) 时，把胶倒到胶板上，室温静置 30 分钟至 1 小时，使胶凝固。EB 先染色的时候，待凝胶冷却到 (50–60°C) 时，加入终浓度是 0.5 μg/ml 的 EB 溶液，搅拌混合均匀后，把胶倒到胶板上，室温静置 30 分钟至 1 小时，使胶凝固。
- 5) 慢慢拔下梳子，注意不要把胶弄破。
- 6) 将凝胶放入电泳槽，加入电泳缓冲液，让电泳缓冲液完全没过胶面。

4. 凝胶电泳 (在操作区 4 进行)

- 1) 连接电泳仪的正负极，DNA 带负电荷，确保 DNA 迁移方向是从负极到正极。
- 2) 加入 1–2 μl 6 × Loading Buffer 至 5–10 μl PCR 产物中，混匀后加入样品孔中。两端的胶孔加适量的 DNA marker (2.5 μl 100 bp DNA Ladder + 0.5 μl 6 × Loading Buffer)。
- 3) 调节电压 50–150 V 使溴酚蓝迁移至样品孔的 3–4 cm 处。

* 溴酚蓝迁移速率较快。

5. 染色条带的确认 (EB 先染色时只进行 3 就可以)

注意：当凝胶先用 EB 染色时，直接进行 3 步骤。

- 1) 准备 1 μg/ml EB 或 SYBR[®] Green I* (TE buffer 或电泳液稀释 10,000 倍)，将凝胶移至染色槽中完全浸没染色。
- 2) 移到染色槽时不要搅动，放置 20–30 min.。
- 3) 将胶块移至紫外线透射装置中观察条带，通过 DNA Marker 判定目的片断条带。

* 当使用 SYBR[®] Green I 染色时，请使用专用器具。

注意：染色过程需要佩戴手套，保证安全。

● 结果判定

样品中如果存在 PA (protective antigen) 基因, 则会出现 211 bp 的片段。如果存在 CAP (involved in capsule synthesis) 基因, 则会出现 591 bp 的片段。扩增内参照时使用 PA 引物会出现 409 bp 条带, 使用 CAP 引物会出现 98 bp 条带。

(1) CAP 基因和 PA 基因呈现阳性或在检出界限以下时

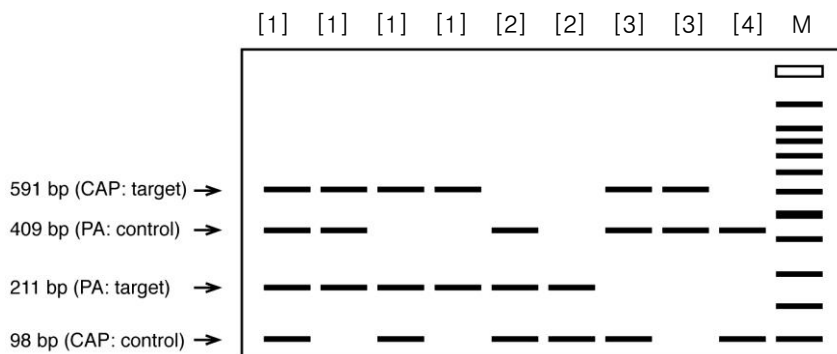


图 2 电泳条带示意图

电泳结果	结果判断
[1] 211 bp 和 591 bp 两个片段均被检出	无论内参片段 (409 bp, 98 bp) 是否被扩增, PA 基因和 CAP 基因均为阳性。(PA 基因和 CAP 基因含量大时内参有可能不被扩增)
[2] 211 bp 片段被检出	无论内参片段 409 bp 是否被扩增, PA 基因为阳性。(PA 基因含量大时内参有可能不被扩增)
[3] 591 bp 片段被检出	无论内参片段 98 bp 是否被扩增, CAP 基因为阳性。(CAP 基因含量大时内参有可能不被扩增)
[4] 没有检测到 211 bp, 591 bp 扩增产物; 但检测到 409 bp, 98 bp 扩增产物。	PA 基因和 CAP 基因在检出界限以下。

(2) 不能判定 PA 基因和 CAP 基因是否存在时

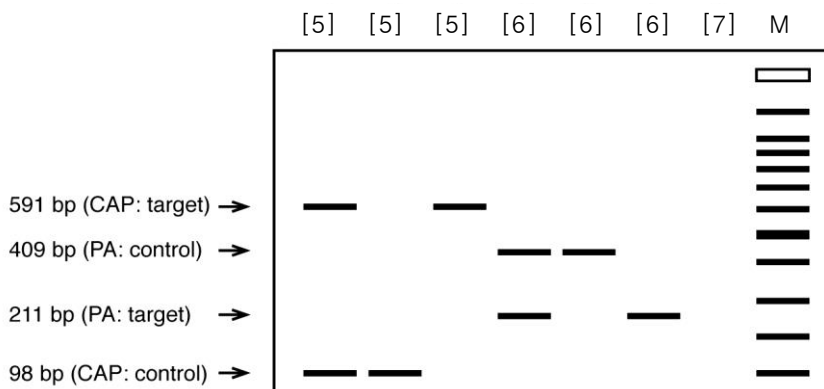


图 3 电泳条带示意图

电泳结果	结果判断
[5] 211 bp 及内参 409 bp 均未被扩增	不能判定 PA 基因的情况, 有可能是某种原因导致 PCR 反应不正常。再进行一次 PCR 反应。(此时可以判定 CAP 基因)
[6] 591 bp 及内参 98 bp 均未被扩增	不能判定 CAP 基因的情况, 有可能是某种原因导致 PCR 反应不正常。建议再进行一次 PCR 反应。(此时可以判定 PA 基因)
[7] 无任何 PCR 扩增片段	PA 基因、CAP 基因均不能判定, PCR 反应失败。请再次进行 PCR 反应。

(3) Negative Control 实验

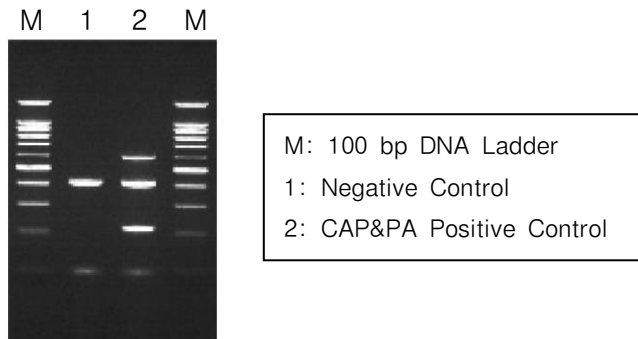
a. 正常结果

检测到 409 bp 和 98 bp 的 PCR 扩增产物。

b. 异常结果:

- 检测到 211 bp 或 591 bp 的 PCR 扩增产物, 表明 PCR 反应体系污染。
- 409 bp 或 98 bp 的 PCR 扩增产物均未被检出 (或只检测到其中一种)。表明 PCR 反应失败, 有可能是引物被分解或酶类失活等。

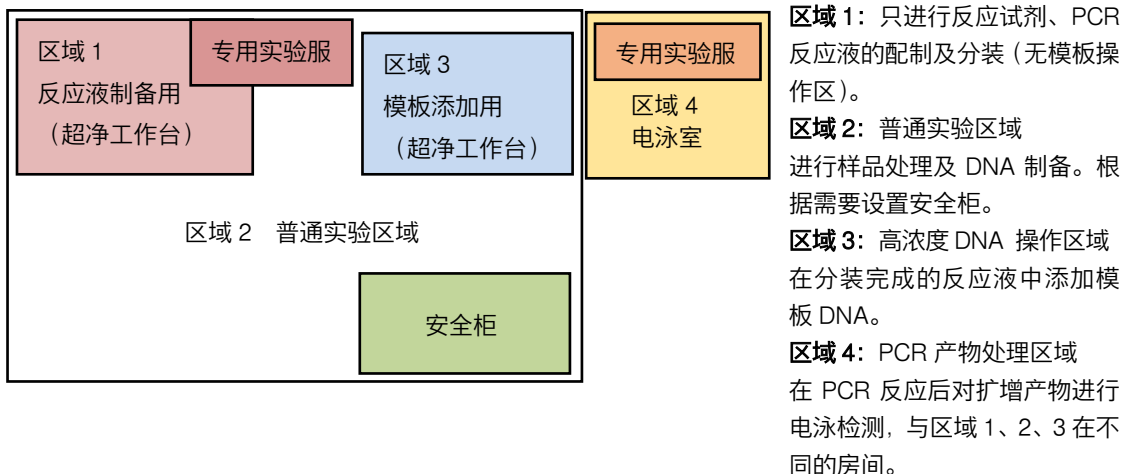
● 实验例



CAP 阳性对照 = *cap* 区域 (M24150)⁴⁾ 克隆至 pHY300PLK

PA 阳性对照 = *pagA* 基因 (M22589) 克隆至 pHY300 PLK

● 补充: 关于区域划分



● 参考文献

- 1) H. I. Cheun, S. -I. Makino, M. Watarai, T. Shirahata, I. Uchida, and K. Takeshi. A simple and sensitive detection system for *Bacillus anthracis* in meat and tissue. *Journal of Applied Microbiology*. (2001) **91**: 421–426.
- 2) S. -I. Makino, H. I. Cheun, M. Watarai, I. Uchida, and K. Takeshi. Detection of anthrax spores from the air by real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*. (2001) **33**: 237–240.
- 3) S. -I. Makino, Y. Iinuma–Okada, T. Maruyama, T. Ezaki, C. Sasakawa, and M. Yoshikawa. Direct Detection of *Bacillus anthracis* DNA in Animals by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. (1993) **31**: 547–551.
- 4) S. -I. Makino, I. Uchida, N. Terakado, C. Sasakawa, and M. Yoshikawa. Molecular Characterization and Protein Analysis of the cap Region, Which Is Essential for Encapsulation in *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*. (1989) **171**: 722–730.
- 5) S. Makino, C. Sasakawa, I. Uchida, N. Terakado, and M. Yoshikawa. Cloning and CO₂–dependent expression of the genetic region for encapsulation from *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology*. (1988) **2**: 371–375.

TaKaRa Ex Taq is a registered trademark of Takara Bio Inc.

SYBR is a registered trademark of Life Technologies Corporation.

PrimeGel 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。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

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