

Code No. RR176

研究用

TaKaRa

TaKaRa 16S rDNA Bacterial
Identification PCR Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存温度	1
● 注意事项	2
● 操作方法	2
● 实验例	3
● 其他说明	4
● Takara 鉴定菌种一览表	4
● 参考文献	4

● 制品说明

本试剂盒是PCR扩增细菌16S rDNA的试剂盒，通过进一步对PCR扩增的DNA片段进行序列分析，可以鉴定被检测细菌种类。细菌的rRNA是细胞内含量最多的RNA，约占RNA总量的80%以上，其分子量大，种类多，由高度保守区和可变区组成。细菌的rRNA包括5S、16S、23S，其中5S rRNA信息量少，不适合分析。23S rRNA尽管分子大，信息量多，但碱基突变速度较快，同样不适用于细菌鉴定。相比之下16S rRNA的遗传较为稳定，长度在1550±200 bp左右，代表信息量适中，是研究系统进化的好材料。目前已经报道了10,000种以上的细菌16S rDNA序列。通过对16S rDNA的序列分析，可以将细菌划分到属或种。

16S rDNA可以通过PCR法扩增获得，由于16S rDNA的两端较为保守，可以在这保守区域设计引物，扩增鉴定细菌的16S rRNA基因，然后进行DNA测序，再将其DNA序列与GenBank中的已知序列进行同源性比较后，可以判定检测细菌种类。

本试剂盒中包含了进行细菌16S rDNA PCR扩增的所有试剂，同时还提供了三条测序用引物（正向测序引物Seq forward、反向测序引物Seq reverse、中间测序引物Seq internal）。PCR扩增引物可以扩增细菌rDNA前500 bp的DNA片段（Forward primer/ Reverse primer1），以及全序列的DNA片段（Forward primer/ Reverse primer2）。16S rDNA的前500 bp序列变化较大，含有丰富的细菌种属的特异性信息，进行DNA测序时一个测序反应即可测通，是一种较为经济便捷的16S rDNA鉴定方法；如果前500 bp序列不足以反映细菌的种属信息时，则可以进行16S rDNA的全序列PCR扩增及DNA测序，得到较为全面的16S rDNA序列信息。

对于难以培养细菌、生化反应不明显及传统表型方法不能鉴定的细菌，使用本试剂盒鉴定未知细菌种类尤为方便。

● 制品内容

PCR Premix*	500 μl×3 支
PCR primers:	
Forward primer (20 pmol/ μl)	30 μl×1 支
Reverse primer1 (20 pmol/ μl)	30 μl×1 支
Reverse primer2 (20 pmol/ μl)	30 μl×1 支
Seq primers:	
Seq forward (10 pmol/ μl)	20 μl×1 支
Seq internal (10 pmol/ μl)	20 μl×1 支
Seq reverse (10 pmol/ μl)	20 μl×1 支
Positive Control DNA (1 ng/ μl)	10 μl×1 支
16S-free H ₂ O	1 ml×3 支

* PCR Premix 中含有 *TaKaRa Ex Taq*[®]、反应应用 Buffer、dNTP Mixture 等，应尽量避免反复冻融。

【测序用引物序列】

引物名称	引物序列
Seq forward	5' -GAGCGGATAACAATTTACACAGG-3'
Seq reverse	5' -CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3'
Seq internal	5' -CAGCAGCCGCGTAATAC-3'

● 保存温度

-20℃保存，使用时请于冰中融化。

● 注意事项

1. 操作注意。
 - ① 本实验所使用的试剂极易污染，实验尽可能在超净工作台中进行。
 - ② 实验人员应穿无细菌污染的实验服，戴口罩和手套，预先用 70%乙醇对实验器具进行消毒等。
 - ③ 实验应使用专用的仪器和耗材，例如：专用的微量移液器及配套的枪头。开启 Microtube 要小心，防止污染等。
2. PCR Premix 的使用方法。

PCR Premix 中含有 *TaKaRa Ex Taq*，应尽量避免反复冻融。
3. 实验用细菌应为纯菌，以确保实验的可信度。

● 操作方法

1. 模板 DNA 的提取。

实验用的细菌基因组 DNA 可以通过传统的苯酚/氯仿抽提法提取，也可以使用本公司生产的 TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0 (Code No. 9763) 获得。

对某些细胞壁比较薄的革兰氏阴性细菌，可以使用灭菌牙签挑取单菌落，然后置于装有 10 μ l 的 16S-free H₂O 的 Microtube 中，99°C 热变性 10 分钟后进行离心分离，取 5~10 μ l 上清液作模板进行 PCR 反应。
2. 按下述组份配制 PCR 反应液。

试剂	使用量
模板 DNA*	50~100 ng
PCR Premix	25 μ l
Forward Primer	0.5 μ l
Reverse Primer1 或 Reverse Primer2	0.5 μ l
16S-free H ₂ O	up to 50 μ l

* 阴性对照使用 1 μ l 的 16S-free H₂O 替代模板 DNA。

阳性对照取 1 μ l 的 Positive Control DNA 作为模板。

3. PCR 反应条件如下。

94°C	5 min	} 30 Cycles
94°C	1 min	
50~55°C	1 min	
72°C	1.5 min	
72°C	5 min	

4. 琼脂糖凝胶电泳。

使用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳，PCR 产物长度因菌种不同各有差异，一般为 500 bp 左右 (Forward Primer/ Reverse primer1) 或 1.5 kb 左右 (Forward Primer/ Reverse Primer2)，阳性对照约为 500 bp 或 1100 bp。
5. PCR 产物的回收及 DNA 测序。

使用切胶回收试剂盒 (Code No. 9762) 回收纯化 PCR 扩增产物，然后进行 DNA 测序，500 bp 的 PCR 扩增片段可以用 Seq forward 或 Seq reverse 引物进行测序，1.5 kb 的 PCR 扩增片段可以用 Seq forward、Seq internal、Seq reverse 引物进行测序。
6. 菌种鉴定。

将 DNA 测序结果与相应的数据库 (NCBI、RDP、EBI 等) 进行对比，确定菌种种类。

● 实验例

使用本试剂盒，对大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、金黄葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 进行了 16S rDNA 的 PCR 扩增，详细实验情况如下。

1. 模板 DNA 的提取。

实验用的细菌基因组 DNA 的提取，使用了 TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0 (Code No. 9763) *。

* 由于金黄葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的细胞壁较厚，用 9763 试剂盒中的 Lysozyme 无法溶解该类细菌的细胞壁，从而不能在 Solution A 中裂解并释放出基因组 DNA。因此在本实验中，在加入 Lysozyme 溶液的同时，还加入了 Glass-beads 对菌体进行了处理，以达到溶解金黄葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 细胞壁的目的。

2. 按下述组份配制 PCR 反应液。

试剂	使用量
模板 DNA*	50~100 ng
PCR Premix	25 μ l
Forward Primer	0.5 μ l
Reverse Primer1 或 Reverse Primer2	0.5 μ l
16S-free H ₂ O	up to 50 μ l

* 阴性对照使用 1 μ l 的 16S-free H₂O 替代模板 DNA。

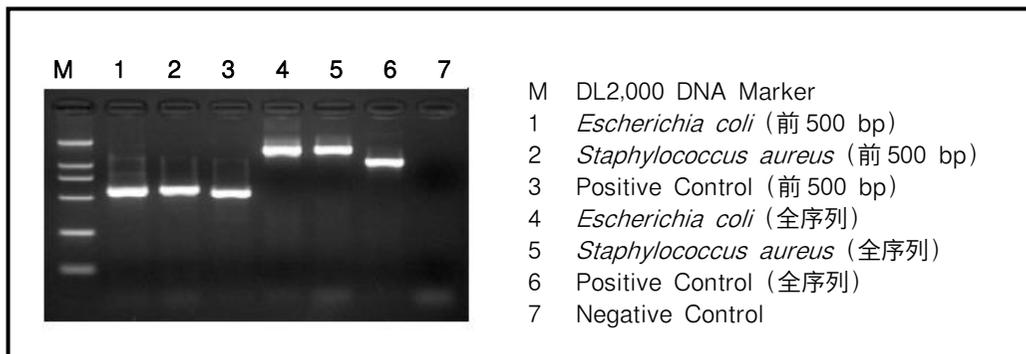
阳性对照取 1 μ l 的 Positive Control DNA 作为模板。

3. PCR 反应条件如下。

94°C	5	min	} 30 Cycles
94°C	1	min	
50°C	1	min	
72°C	1.5	min	
72°C	5	min	

4. 琼脂糖凝胶电泳。

使用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳，电泳结果见下图。



● 其他说明

1. 实验时应进行阴性对照实验，可以检测 PCR 反应体系是否有细菌污染。
2. PCR 反应用模板以菌体的基因组 DNA 为佳，对于某些细胞壁比较薄的革兰氏阴性细菌，也可以直接挑取菌落进行 16S rDNA 的快速检测。

● Takara 鉴定菌种一览表

	菌体英文名称	菌体中文名称
1	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希氏菌
2	<i>Paracoccus denitrificans</i>	脱氮副球菌
3	<i>Deinococcus Radiophilus</i>	抗辐射奇异球菌
4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	根癌农杆菌
5	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	嗜热脂肪芽孢杆菌
6	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	金色链霉菌
7	<i>Neisseria mucosa</i>	粘液奈瑟球菌
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	金黄葡萄球菌
9	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌
10	<i>Nocardia</i>	诺卡菌属
11	<i>Curtobacterium</i>	短小杆菌属
12	<i>Corynebacterium</i>	显核菌属
13	<i>Brevibacterium</i>	短杆菌属
14	<i>Microbacterium</i>	微杆菌属

● 参考文献

1. William G. Weisburg, Susan M. Barns, Dale A. Pelletier, David J. Lane (1991) *J. Bacteriol.*173: 697-703.
2. Jörg Overmann, Marco J. L. Coolen, Christian Tuschak (1999) *Arch Microbiol.*172: 83-94.
3. Tom Coenye, Lixia Liu, Peter Vandamme (2001) *J. Clin. Microbiol.*39: 4452-4455.
4. K Reilly, V. R. Carruthers, G. T. Attwood (2002) *Microb Ecol.*43: 259-270.

TaKaRa Ex Taq is a registered trademark 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。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>