

TaKaRa Code: DCY219

---

**CycleavePCR<sup>®</sup> 炭疽菌  
Detection Kit Ver.3.0**

(25  $\mu$ l 反应 $\times$ 96 次量, PA 和 CAP 各 48 次量)

---

说明书

**TaKaRa**

宝生物工程(大连)有限公司

# 目 录

内 容	页 码
●制品说明	1
●制品内容	1
●保 存	1
●探针标记	2
●操作注意事项	2
●操作流程	2
●结果分析	4

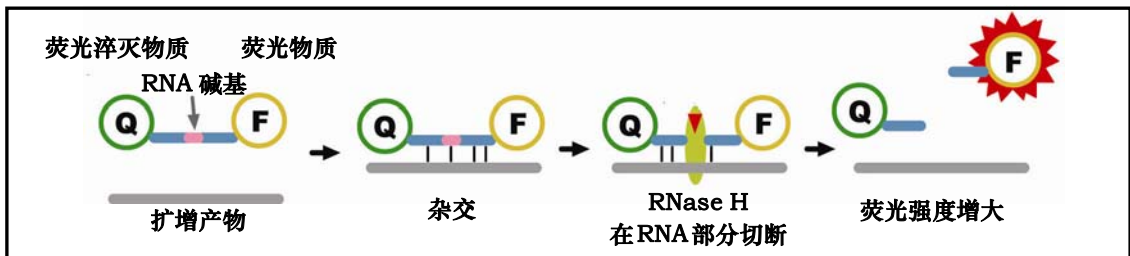
## ● 制品说明

炭疽菌为需氧性革兰氏阳性芽孢杆菌，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，菌体便显示出病原性。

本制品是通过 Cycling Probe 法快速检测 pX01 质粒上 PA 基因和 pX02 质粒上 capA 基因的试剂盒。制品中炭疽菌检出用探针用 FAM 标记，内参照探针用 ROX 标记。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。另外，制品中 DNA 聚合酶使用了改良后的 Hot Start 法用 DNA 聚合酶 *TaKaRa Ex Taq HS*，可以有效抑制非特异性的 PCR 扩增，大大提高 PCR 的扩增效率。

Cycling Probe 法 (原理见下图) 是由 RNA 和 DNA 构成的杂合探针与 RNase H 组合使用的高灵敏度检出法，能够高效率地检出扩增过程中及扩增结束时的目的基因片段。Cycling Probe 内部含有 RNA 碱基，一端标记荧光物质，另一端标记荧光淬灭物质，当探针处于完整状态时，由于荧光淬灭作用抑制荧光物质发出荧光，但当探针与扩增产物中的互补序列杂交后，RNase H 在 RNA 部分将探针切断，淬灭抑制作用解除，荧光物质发出荧光，通过测定荧光强度，能够实时监控扩增产物量。

Cycling Probe 法技术原理图。本技术由 ID Biomedical 公司授权。



## ● 制品内容 (25 $\mu$ l $\times$ 96 次量; PA 和 CAP 各 48 次量)

1. <i>TaKaRa Ex Taq HS</i> (5 U/ $\mu$ l)	25 $\mu$ l (96 次)
2. Tli RNase H II*1 (200 U/ $\mu$ l)	50 $\mu$ l (96 次)
3. 5 $\times$ Reaction Mixture*2	500 $\mu$ l (96 次)
4. PA Primer Mix (PA7, PA6) (3 $\mu$ M each)	250 $\mu$ l (48 次)
5. CAP Primer Mix (MO11, MO25) (3 $\mu$ M each)	250 $\mu$ l (48 次)
6. PA Probe Mix (FAM 标记、ROX 标记) (12.5 $\times$ conc.) *3	100 $\mu$ l (48 次)
7. CAP Probe Mix (FAM 标记、ROX 标记) (12.5 $\times$ conc.) *3	100 $\mu$ l (48 次)
8. PA Positive Control (1 $\times$ 10 <sup>4</sup> Copies/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l (20 次)
9. CAP Positive Control (1 $\times$ 10 <sup>4</sup> Copies/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l (20 次)
10. dH <sub>2</sub> O	1.3 ml

\*1 Tli RNase H II 是来源于 *Thermococcus litoralis* 的耐热性 RNase H 酶。

\*2 含有 dNTP Mixture、Internal Control DNA。

\*3 荧光标记 Probe 应避光保存。

## ● 保 存: -20 $^{\circ}$ C

## ● 探针标记

### PA Probe Mix

	Target	Reporter	Quencher
Probe Mix	PA 型	FAM	Eclipse
	Internal Control	ROX	Eclipse

### CAP Probe Mix

	Target	Reporter	Quencher
Probe Mix	CAP 型	FAM	Eclipse
	Internal Control	ROX	Eclipse

## ● 操作注意事项

1. Real Time PCR 仪的使用请按照说明书进行。
2. 如果探针、引物因混入核酸酶而被降解，则不能准确进行检测。实验者的汗液和唾液也会带入核酸酶，操作时应注意。
3. 判断为阳性的样品，要用微生物学方法进行再确认。
4. PCR 反应是灵敏度非常高的反应。为防止污染，建议从反应液的配制到检测的实验过程中，设定以下 3 个实验区域，并进行物理性隔离。

区域 1：反应液的配制及分装。此时不要开闭装有扩增产物或检测样品的 Tube 管。

区域 2：检测样品的制备。此时不要开闭装有扩增产物或检测样品的 Tube 管。

区域 3：向反应液中添加检测样品，进行反应、检出。

由于本制品是使用 Real Time PCR 的方法，扩增反应与检测同时进行，反应后的扩增产物不需要再进行电泳。为了避免污染，严禁从 Tube 管中取出扩增产物。

## ● 操作流程

1. 样品的制备（在区域2进行）。

<培养液样品>

取10 μl培养液，加入100 μl灭菌蒸馏水，95℃ 15 min加热处理。

离心，取上清液1 μl直接进行PCR反应。

<平板菌体>

1) 用灭菌牙签挑取微量菌，放在100 μl灭菌蒸馏水中，95℃ 15 min加热处理。

2) 离心，取上清液1 μl直接进行PCR反应。

<粉末状样品>

1) 取适当量样品，放在1 ml灭菌蒸馏水中充分悬浊。

2) 离心后，倒掉上清，再一次加入1 ml灭菌蒸馏水充分悬浊，洗净。

3) 最后用100 μl灭菌蒸馏水充分悬浊。

4) 95℃ 15 min加热处理。

5) 离心，取上清液1 μl直接进行PCR反应。

2. PCR 反应（在区域1进行）

以下是使用Smart Cycler System进行PA和CAP的Positive Control反应例。

为得到正确的检测结果，每种目的基因检测同时都需进行各自的阳性对照和阴性对照实验。

1) 在冰上配制以下反应液 (在区域 1 进行)。

试剂	使用量
5×Reaction Mixture	5.0 μl
PA or CAP Primer (3 μM each)	5.0 μl
PA or CAP Probe (12.5×conc.)	2.0 μl
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/μl)	0.25 μl
Tli RNase H II (50 U/μl)	0.5 μl
Sample (模板)	1.0 μl
灭菌水	11.25 μl
Total	25.0 μl

2) 样品 (模板) 的添加 (在区域 3 进行)。

一管作为阴性对照加灭菌蒸馏水, 剩余的 Tube 里添加样品或阳性对照, 盖紧盖。  
注) 因为是定量检测, 所以在盖 Tube 管盖时要戴手套, 避免污染。

3) 将 Tube 管用小型离心机进行轻微离心, 放置于 Real Time PCR 仪上进行反应。

4) 反应条件设定

Stage 1: 初期变性

Hold

95°C 10 秒

Stage 2: PCR 反应

Repeat 40 times

95°C 5 秒

55°C 10 秒

72°C 15 秒\*

Stage 1			Stage 2			
Hold			Repeat 50 times.			
Temp	Secs	Optics	3-Temperature Cycle			
95.0	10	Off	Deg/Sec	Temp	Secs	Optics
			NA	95.0	5	Off
			NA	55.0	10	Off
			NA	72.0	15	On
<input type="checkbox"/> Advance to Next Stage						

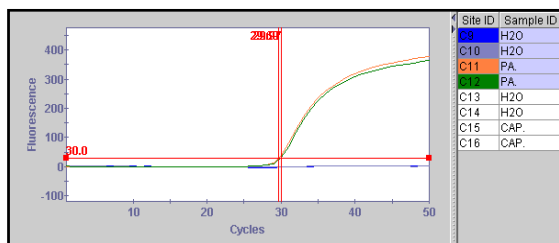
\* 使用仪器不同, 设定时间不同。

使用 Applied Biosystems 公司 Real Time PCR 扩增仪时必须根据仪器型号设定不同时间。  
7700/7900HT 设定为 30 秒, 7000/7300 设定为 31 秒, 7500 设定为 34 秒, 7500 Fast 设定为 25 秒。

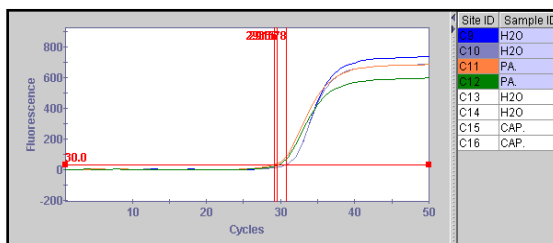
其它仪器设定时间根据仪器使用说明在一定范围内进行调整。

3. 使用 Real Time PCR 仪进行反应和结果判定 (在区域 3 进行)。

[PA Positive Control 扩增曲线]

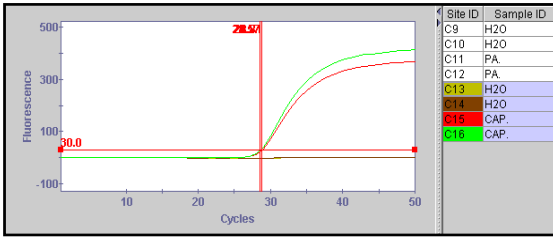


PA 基因扩增曲线图 (FAM 标记)

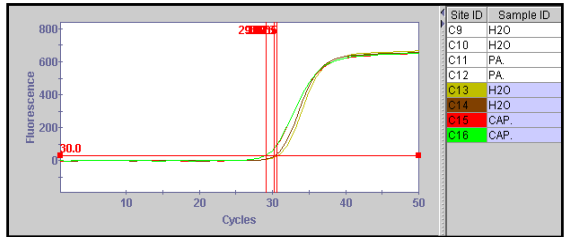


Internal Control 扩增曲线图 (ROX 标记)

[CAP Positive Control 扩增曲线]



CAP 基因扩增曲线图 (FAM 标记)



Internal Control 扩增曲线图 (ROX 标记)

4. 结果分析 (在区域3进行)。

请参见“结果分析”部分。

● 结果分析

为确保检测结果的准确性, 在进行样品检测时, 请务必进行 Negative Control 和 Positive Control 实验。

① Negative Control 实验

在配制 Real Time PCR 反应液时, 用 dH<sub>2</sub>O 替代检测样品。

FAM 荧光	ROX 荧光	结果判定
-	+	结果正常
+	+	PCR 反应体系污染。在确保反应体系不被污染的情况下再次进行反应。

② Positive Control 实验

在配制 Real Time PCR 反应液时, 用 Positive Control 替代检测样品。

FAM 荧光	ROX 荧光	结果判定
+	+	结果正常
-	+	PCR 反应失败。可能是未添加 PA、CAP Positive Control 或 PA、CAP Positive Control 分解。
-	-	PCR 反应失败。可能是实验操作失败或试剂失活。

### ③ 实际样品的检测

FAM 荧光	ROX 荧光	结果判定
+	-*1 (+)	如果同时进行的 Negative Control 实验结果正常，检测实际样品时，不管 ROX 荧光信号是否被检出（如果检测样品浓度高会抑制 Internal Control DNA 的扩增），如果有 FAM 荧光检出，可以判定 PA 或者 CAP 基因阳性
-*3	+	如果同时进行的 Negative Control 实验结果正常，检测实际样品时，如果有 ROX 荧光检出，没有 FAM 荧光检出，可以判定 PA 或者 CAP 基因阴性或者在检出界限以下。
-*2	-*2	PCR 反应失败。注意以下几方面后再次进行反应。 ①如果同时进行的 Positive Control 实验结果正常，则可能是样品 DNA 制备有问题，如样品中可能存在 PCR 反应的抑制物等。 ②如果同时进行的 Positive Control 实验结果不正常，则可能是实验操作失败或试剂失活。

- \*1: 各反应管中 FAM 通道检出结果为阳性，ROX 通道无荧光信号检出时，判定样品为阳性。（如果检测样品浓度高，会抑制 Internal Control DNA 的扩增，不会影响正常结果判断）。
- \*2: 如果所有通道都无荧光信号值，可能是 PCR 反应受到阻害。
- \*3: 如果同时进行的 Positive Control 实验结果正常，检测实际样品时有 ROX 荧光检出，无 FAM 荧光检出，可能是样品中 DNA 含量在检出界限以下。

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686  
8008909508, 4006518769

**宝生物工程（大连）有限公司**

**TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.**

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话： 0411-87641681 87641683

传 真： 0411-87619946 87621675

E.mail: [service@takara.com.cn](mailto:service@takara.com.cn)

网 址： <http://www.takara.com.cn>

V2010.04

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂