

製品コード RR027

研究用

TaKaRa

**TaKaRa 炭疽菌
PCR Detection Kit**

説明書

v201901Da

炭疽菌は芽胞を形成する好気性グラム陽性桿菌（1～2×5～10 μm）です。その病原性は2種類の毒性プラスミド（pX01、pX02）によるものです。pX01 プラスミドは3種類の毒素成分（PA: protective antigen、LF: lethal factor、EF: edema factor）をコードしています。一方、pX02 プラスミドは莢膜合成に関係する遺伝子（*capA*、*capB*、*capC*）をコードしています。これら2種類の毒性プラスミドの両方を保持する株は、病原性を示します。どちらか一方のみの毒性プラスミドを保有する株は、病原性を示しません。

PCR法は、ごく微量のDNAを鋳型として用いて、目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術です。DNAの熱変性、プライマーのアニーリング、DNAポリメラーゼによる伸長反応の3ステップからなる工程を1サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子断片を100万倍にまで増幅させることができます。

本キットはpX01 プラスミドに含まれるPA遺伝子およびpX02 プラスミドに含まれる*capA* 遺伝子をPCR法により1本のチューブで同時に増幅し、アガロースゲル電気泳動により検出するためのキットです。増幅にはHot Start PCR用酵素、*TaKaRa Ex Taq*[®] HSを使用しているため、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことが出来、高感度の検出が可能になります。また本キットにはインターナルコントロールが含まれているため、偽陰性をモニターすることができます。

なお、本キットの製品化に当たり、帯広畜産大学畜産学部獣医学科 牧野壯一先生に御協力をいただきました。

I. 内容 (48 回用)

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

* 1 : dNTP Mixture、Internal Control を含む。

* 2 : 36% グリセロール、30 mM EDTA、0.05% Bromophenol Blue、0.035% キシレンシアノール

	プライマー名	配列	ターゲット	インターナルコントロール
PA Primers	(PA7) (PA6)	(5'- ATCAC CAGAG GCAAG ACACC C -3') (5'- ACCAA TATCA AAGAA CGACG C -3')	211 bp	409 bp
CAP Primers	(M011) (M012)	(5'- GACGG ATTAT GGTGC TAAG -3') (5'- GCACT GGCAA CTGGT TTTG -3')	591 bp	98 bp

II. 保存 - 20℃

III. キット以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

本キットを用いた検出過程では、さらに次のような試薬、機器が必要です。

【試薬】

1. 滅菌精製水
2. PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
3. 電気泳動用 buffer
TBE (Tris-Borate-EDTA) Buffer powder (製品コード T905) など
4. DNA 染色剤
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A)
またはエチジウムブロマイド

【機器】

1. サーマルサイクラー
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Touch* (製品コード TP350)
2. 電気泳動装置
Mupid-2plus (製品コード M-2P)
Mupid-exU (製品コード EXU-1)
Mupid-One (製品コード O1-01) など
3. 電気泳動ゲル撮影用装置 (SYBR Green I を使用する場合は専用のフィルターが必要です。)
4. UV トランスイルミネーター (300 nm 前後のもの)
5. ヒートブロック (95°Cまで温度を上げられるもの)
6. 1.5 ml チューブ対応型冷却遠心機

【その他】

1. 0.2 ml PCR tube
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200) など
2. マイクロピペット
3. マイクロピペット用チップ (疎水性フィルター付き)
4. アガロースゲル染色用トレイ (SYBR Green I を使用する場合はポリプロピレン 製容器を使用してください。)

IV. 使用上において

- ・本製品は遺伝子検出であるため、不活化された細菌も検出し、生菌のみを検出対象とするものではありません。また、設計した Primer の配列内に遺伝子の変異や欠損／挿入が生じた際には、検出できない場合があります。
(検査結果判定により発生する問題に関して、タカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。)
- ・判定の確定には、遺伝子検査だけでなく、グラム染色などを含めた一般的な微生物学的手法による結果も併用の上、ご判断ください。

V. 操作上の注意

1. 万一、プライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。(手袋・マスク着用等)
2. 反応液の調製から検出まで、次の4つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します(X. 補足：エリア分けについてを参照)。コンタミネーション発生の原因となりますので、エリア4以外では増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア1：PCR 反応液の調製、分注を行います。
 - エリア2：検体の調製 (DNA 抽出等) を行います。
 - エリア3：PCR 反応液へ鋳型 DNA の添加を行います。
 - エリア4：電気泳動等で PCR 増幅産物の解析を行います。

VI. PCR の原理

PCR (Polymerase Chain Reaction) 法とは、

DNA 鎖の熱変性 (denaturation step)
プライマーのアニーリング (annealing step)
ポリメラーゼによる伸長反応 (extension step)

を繰り返し行うことにより *in vitro* で DNA を増幅する方法です (図 1 参照)。
この方法を用いると、DNA を数時間で少なくとも 100 万倍に増幅できます。

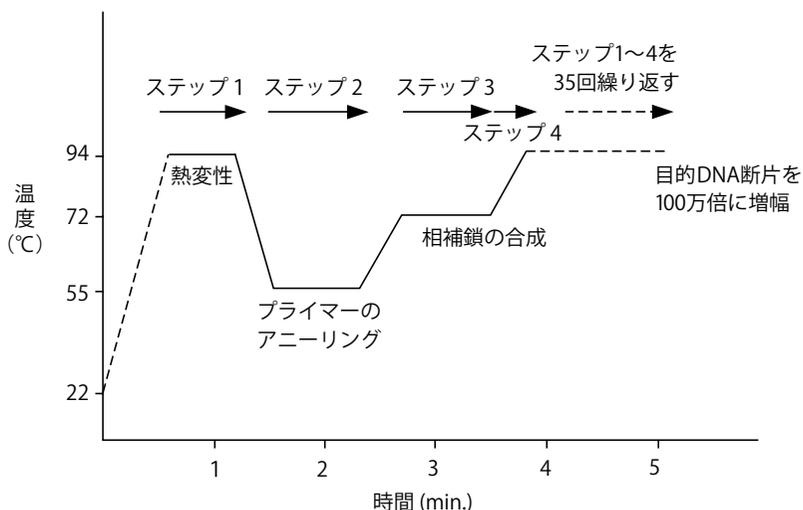


図1. PCRによるDNA増幅の工程

- ステップ 1: プライマー、dNTP、ポリメラーゼを含んだ反応液中で、目的とする 2 本鎖 DNA 断片を熱変性する。
- ステップ 2: 熱変性により生じた 1 本鎖鋳型 DNA にプライマーをアニーリングする。
- ステップ 3: DNA ポリメラーゼを用いて相補鎖 DNA を合成する。
- ステップ 4: 増幅産物としての 2 本鎖 DNA を再度熱変性して 1 本鎖にする。
(ステップ 1 に戻る)

ステップ 1～4 を 1 サイクルとして、35 サイクル繰り返す。ただし、目的 DNA 断片により、増幅の最大効率を得る条件が異なるので、目的 DNA 断片に応じて設定条件を変更する。

VII. 操作

1. サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

【培養液から】

- 1) 培養液 10 μ l を滅菌精製水 100 μ l に加え、95°C で 15 分間加熱する。
- 2) 遠心し、その上清 1 μ l を直接 PCR に使用する。

【プレート上の菌体から】

- 1) 滅菌爪楊枝でごく僅かを取り、滅菌精製水 100 μ l に懸濁する（ごく僅かに濁る程度で充分である）。
- 2) 95°C で 15 分間加熱する。
- 3) 遠心し、その上清 1 μ l を直接 PCR に使用する。

【粉状サンプルから】

- 1) 適当量（ごく僅かに濁る程度で充分）を滅菌精製水 1 ml に懸濁する。
- 2) 遠心後、もう一度滅菌精製水 1 ml に懸濁し、洗浄する。
- 3) 最終的に滅菌精製水 100 μ l に懸濁する。
- 4) 95°C で 15 分加熱する。
- 5) 遠心し、その上清 1 μ l を直接 PCR に使用する。

注意：サンプルには危険病原体が含まれる可能性がありますので、操作には十分な注意が必要です。使用した器具類、培地および洗浄液等は定められた方法で処理してください。

2. PCR 反応例

- 1) 以下の反応液を各 0.2 ml PCR tube に調製する。(エリア 1 で実施)
検体サンプル等の Template 以外のコンポーネントを必要本数 + α 分調製後、各反応チューブに 49 μ l ずつ分注し、軽くふたをする。
その内の 1 本にネガティブコントロールとして 1 μ l の滅菌精製水を加え、しっかりとふたをする。

試薬	液量	終濃度
5 × Reaction Mixture	10 μ l	1 ×
CAP Primers (10 μ M)	4 μ l	0.8 μ M each
PA Primers (10 μ M)	4 μ l	0.8 μ M each
Template*	1 μ l	
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/ μ l)	0.25 μ l	0.025 U/ μ l
滅菌精製水	30.75 μ l	
Total	50 μ l	

* : Template のかわりに滅菌精製水を加えたものを 1 本用意しネガティブコントロールとする。

- 2) サンプル (Template) を添加する。(エリア 3 で実施)
ネガティブコントロール以外の各チューブに、検体サンプルまたはポジティブコントロールを添加し、しっかりとふたをする。反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心を行い、PCR 装置にセットする。

【PCR 条件】

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

5 ~ 10 μ l を電気泳動へ

反応後のサンプルは、4°C または - 20°C で保存可能である。

3. アガロースゲルの作製

- 1) 三角フラスコに電気泳動用 buffer を入れ、PrimeGel Agarose PCR-Sieve になるように攪拌しながらゆっくり加える。
- 2) 電子レンジで2～3分加熱する。取り出してよく攪拌し、溶液が均一に溶解していることを確認する。完全に溶解していない場合再び加熱する。
- 3) ゲル板の準備をする。
- 4) アガロースゲルが50～60℃に冷めたらゲル板にアガロースを注ぎ、サンプルを注入するためのスロットを作製するためにコームを差し込み、30分～1時間室温で放置して、ゲルを固める。
(エチジウムブロマイド先染めの場合)
ゲル溶液が50～60℃に冷めたら最終濃度0.5 µg/mlになるようにエチジウムブロマイド水溶液を加え、均一になるように穏やかに攪拌した後、ゲル板に注ぐ。30分～1時間室温で放置して、ゲルを固める。
- 5) ゲルが破れないように注意しながらゆっくりとコームを抜き取る。
- 6) アガロースゲルを泳動槽にセットし、ゲルが充分つかるまで電気泳動 buffer を泳動槽に加える。

4. 電気泳動 (エリア 4 で実施)

- 1) 電極を+、-を間違えないように接続する。(PCRで増幅した核酸は負に荷電しており、- → +に泳動される。)
- 2) PCR反応終了後の各反応液5～10 µlに1/5量の6×Loading bufferを加えて混合し、マイクロピペットを用いてゆっくりとゲルのスロットに注入する。[両側のスロットにはDNAマーカー(2.5 µlの100 bp DNA Ladderに0.5 µlの6×Loading bufferを加えたもの)を注入する。]
- 3) 50～150 Vの定電圧をかけ、Bromophenol Blue (速く泳動する色素)がコームから3～4 cmに移動するまで電気泳動する。

5. 染色バンドの確認 (エチジウムブロマイド先染めの場合は3)のみでよい)

- 1) ゲルが十分浸せる量の1 µg/mlのエチジウムブロマイド水溶液、またはSYBR Green I溶液 (TE bufferまたは電気泳動 bufferで10,000倍希釈したもの)を調製し、アガロースゲル染色用トレイに入れておく。
- 2) 電気泳動したゲルをトレイに入れ20～30分静置する。
- 3) UVトランスイルミネーターにゲルをセットして写真を撮影し*、DNAマーカーと照らし合わせ、核酸のバンドの有無とサイズを確認する。

* : SYBR Green Iを使用する場合は、専用フィルターを用いる。

操作上の注意

エチジウムブロマイド、SYBR Green Iを扱う場合、およびこれらDNA染色剤で染色したゲルを取り扱う場合は、必ず手袋を着用し、直接液が触れないようご注意ください。

VIII. 判定

サンプル中に PA (protective antigen) 遺伝子が存在すれば、211 bp の増幅産物 (バンド) が検出される。また CAP (莢膜合成に関係) 遺伝子が存在すれば、591 bp のバンドが検出される。インターナルコントロールでの増幅バンドは PA Primers では 409 bp、CAP Primers では 98 bp のバンドが検出される。

(1) 両遺伝子について、陽性あるいは検出限界以下の判定が可能な場合 (図 2 参照)

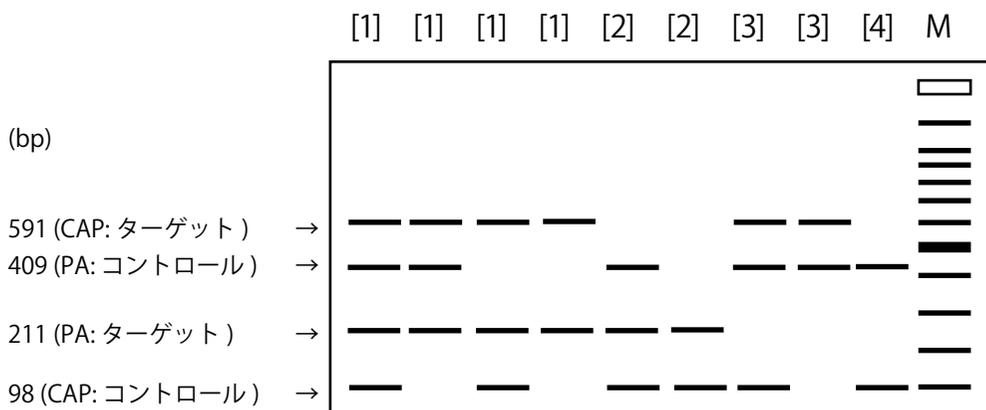


図2. 電気泳動パターン

電気泳動結果	判定
[1] 211 bp、591 bp の両方のバンドが検出された。	インターナルコントロールのバンド (409 bp、98 bp) の有無に関わらず、PA 遺伝子、CAP 遺伝子ともに陽性である。(PA 遺伝子、CAP 遺伝子がサンプル中に多量に存在する場合、インターナルコントロールのバンドは消失する。)
[2] 211 bp が検出された。	インターナルコントロールのバンド 409 bp の有無に関わらず、PA 遺伝子陽性である。(PA 遺伝子がサンプル中に多量に存在する場合、インターナルコントロール 409 bp のバンドが消失することもある。)
[3] 591 bp が検出された。	インターナルコントロールのバンド 98 bp の有無に関わらず、CAP 遺伝子陽性である。(CAP 遺伝子がサンプル中に多量に存在する場合、インターナルコントロール 98 bp のバンドが消失することもある。)
[4] 211 bp、591 bp いずれのバンドも検出されず、かつインターナルコントロールのバンドが 2 本 (409 bp、98 bp) 検出された。	PA 遺伝子、CAP 遺伝子ともに検出限界以下である。

(2) 一方、または両遺伝子の判定ができない場合 (図3 参照)

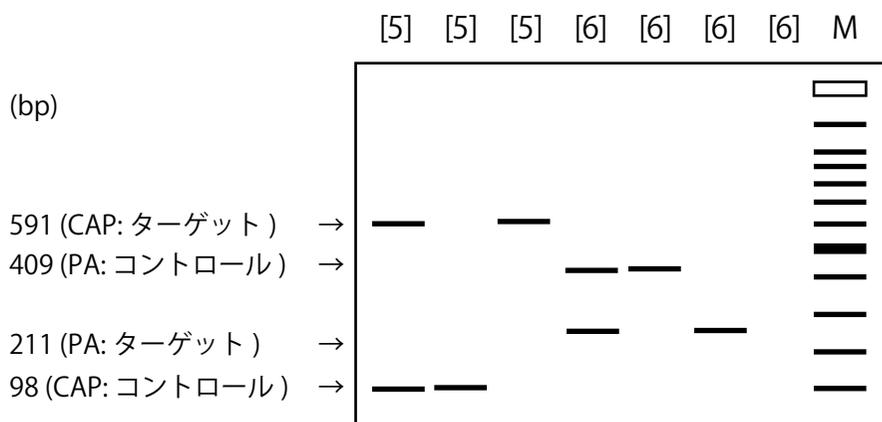


図3. 電気泳動パターン (2)

電気泳動結果	判定
[5] 211 bp およびインターナルコントロール 409 bp のバンドが検出されない。	PA 遺伝子について陽性、検出限界以下を確定できない。なんらかの原因で PCR 反応が正常に行われていない可能性が高いので、再度反応を行う。(CAP 遺伝子については判定可能)
[6] 591 bp およびインターナルコントロールの 98 bp のバンドが検出されない。	CAP 遺伝子について陽性、検出限界以下を確定できない。なんらかの原因で PCR 反応が正常に行われていない可能性が高いので、再度反応を行う。(PA 遺伝子については判定可能)
[7] いずれのバンドも検出されない。	PA 遺伝子、CAP 遺伝子のどちらについても判定できない。なんらかの原因で PCR 反応が正常に行われていないので、再度反応を行う

(3) ネガティブコントロールについて

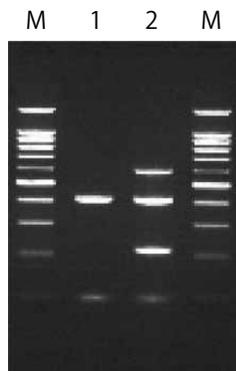
正常な結果

- ・ 409 bp、98 bp のバンドのみが検出される。

異常な結果

- ・ 211 bp または 591 bp のバンドが検出された場合 (409 bp、98 bp のバンドの有無に関わらず)
 - コンタミネーションを起こしている。
- ・ 409 bp、98 bp のどちらか一方が検出されない、またはどちらも検出されない場合
 - 操作ミス、あるいはプライマーの分解や酵素の失活などの可能性が考えられる。

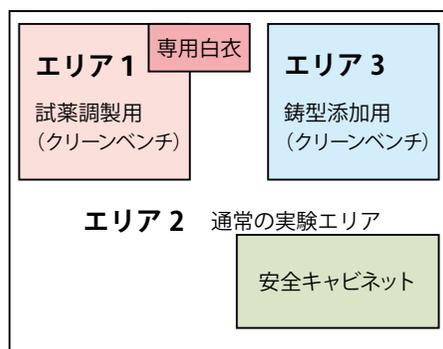
IX. 実験例



M : 100 bp DNA Ladder
1 : 陰性コントロール
2 : CAP&PA 陽性コントロール

CAP 陽性コントロール = *cap* region(M24150)⁴ cloned into pHY300PLK
PA 陽性コントロール = *pagA* gene (M22589) cloned into pHY300PLK

X. 補足：エリア分けについて



専用白衣
エリア 4
電気泳動室

- エリア 1：反応試薬のみを扱うエリア
PCR 反応液の調製、分注を行う。
(鑄型となる DNA は一切持ち込まない)
- エリア 2：通常の実験エリア
検体の取扱いや DNA 調製を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。
- エリア 3：高濃度 DNA を扱うエリア
分注済みの反応液への鑄型 DNA の添加を行う。
- エリア 4：PCR 産物を取扱うエリア
PCR 後の増幅産物を電気泳動する場合は、エリ
ア 1、2、3 とは異なる別室で行う。

XI. 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 realtime 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.

XII. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- *TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。SYBR は Life Technologies Corporation の登録商標です。PrimeGel はタカラバイオ株式会社の商標です。本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社