計畫編號：DOH94-DC-2018

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

利用即時聚合酶鍊反應 (real-time PCR) 進行卡介苗之效價分析
(Potency analysis of BCG vaccine using real-time PCR)

研 究 報 告

執行機構：血清疫苗研製中心

計畫主持人：連偉成

研究人員： 廖明一、賴政宏、王琪婷

執行期間： 94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

＊本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見＊

目　　錄

	頁碼
壹、報告摘要	2
一、中文摘要	3
二、英文摘要	4
貳、本文	5
一、前言	6
二、材料與方法	8
三、結果與討論	12
四、參考文獻	16
參、圖、表	19
Figure 1. BCG 16S rRNA primers 與 probe 的測試	20
Figure 2. BCG 16S rRNA 檢測標準曲線之建立 (十倍系列稀釋)	21
Figure 3. BCG 16S rRNA 檢測標準曲線之建立 (五倍系列稀釋)	22
Figure 4. 以 BCG 16S rRNA Q-PCR 標準曲線檢測已知 BCG 濃度的檢體	23
Figure 5. 以 BCG 16S rRNA QPCR 檢測 BCG 菌的生長	24
Table 1. BCG 16S rRNA 檢測標準曲線具有相當高的再現性	25
肆、附錄	26
附錄一、DNA sequence of BCG 16S ribosomal RNA gene	27
附錄二、SOP for BCG DNA Real-Time Quantitative PCR	29

壹、

報　告　摘　要

一、中 文 摘 要

結核病是目前全球傳染病中死亡率最高的疾病，由於抗藥菌株的產生以及與愛滋病的共同感染而使得結核病的控制面臨更嚴厲的挑戰。目前，結核病的預防主要是施打卡介苗，卡介苗是世界上使用最廣泛的疫苗之一，其優點是沒有施打時間的限制、便宜、副作用小、穩定性高。卡介苗目前仍然是採用培養後統計可培養之菌落數來判定疫苗之效價。卡介苗菌的生長十分緩慢，培養時間有時甚至長達二個月，製程監控不易達到效果。因此，研發一種快速、敏感度高、且專一性高的檢測方法，不僅有助於疫苗製造上之品質控制，在預防接種時用為疫苗效價之監控，對肺結核病的防治也有相當大的助益。本計劃的目的即是利用 Q-PCR 技術檢測 BCG 16S ribosomal RNA 基因，並已建立一個快速、敏感度高、且專一性高的 BCG 效價檢測方法，並期望能夠將此技術應用，以做為 BCG 疫苗生產製程中管控 (in process control) 的工具，以取代曠日費時的傳統檢測方法。

關鍵字：肺結核、卡介苗菌、即時聚合酶鍊反應

二、英 文 摘 要

Tuberculosis is one of the important infectious diseases with the highest mortality rate worldwide. The control of tuberculosis infection is facing an even more strict challenge because of the evolving of drug-resistant clones and the co-infection of AIDS. Currently, the prevention of tuberculosis is mainly done by BCG vaccination, which is one of the most widely used vaccines. The advantages of BCG vaccine are its low cost, low side effects, and high stability. At present, the BCG potency is analyzed by calculating the growth of colonies after culture. However, the growth of BCG is pretty slow, sometimes it can take as long as two months and has made the in process control become very difficult. Therefore, the development of a rapid detection method with high sensitivity and high specificity not only can help to examine the in process control but also can monitor the inoculation potency and finally benefit the prevention of tuberculosis infection. The aim of this study was to establish a rapid, sensitive, and specific real-time quantitative PCR (Q-PCR) method for the detection of BCG potency and we have successfully established the BCG 16S ribosomal RNA gene Q-PCR detection system. We hope we will be able to apply this method as a tool for the in process control during the BCG vaccine production and to replace the time-consuming traditional culture method.

Key words: Tuberculosis, BCG, real-time quantitative PCR

貳、

本　　文

一、前　言

結核病是世界上重要的傳染病之一，也是死亡率最高的傳染病 (Dye et al., 1990; Raviglione et al., 1995) 隨著抗藥菌株的產生及愛滋病的盛行，使得結核病的控制面臨更嚴厲的挑戰 (Barnes et al., 1991; Kaufmann, 2002; Kochi, 1991)。施打卡介苗是目前預防的最主要方法，卡介苗是世界上使用最廣泛的疫苗之一，其優點是沒有施打時間的限制、便宜、副作用小、穩定性高。卡介苗是活菌疫苗，由牛型結核桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis* Bovis) Calmette-Gurin 氏菌 (BCG) 繁殖於適當的培養液內，經冷凍乾燥而製成。由於活菌疫苗必須確保菌體之存活才能在注射後發揮預防疾病的功效。目前疫苗之效價仍然是採用培養後統計可培養之菌落數來判定。大多數卡介苗菌的生長十分緩慢，培養時間有時甚至長達二個月，而且統計結果易有誤差，不能明確定出疫苗之菌數。因此，研發一種快速、敏感度高、且專一性高的檢測方法來進行 BCG 疫苗之效價檢測分析，以取代傳統曠日費時之微生物培養模式實有其必要性與急迫性。

近年來，及即時聚合酶鍊反應 (Real-time quantitative PCR; Q-PCR) 已成功用來快速偵測或是鑑定不同的微生物，如 parrvovirus B19 (Harder et al., 2001)、*Pneumocystis carinii* (Larsen et al., 2002)、Streptococcus pneomoniae

(McAvin et al., 2001)，而且也可以用來有效檢測 Mycobacteria (Liebana et al., 1995; Mangiapan et al., 1996; Kraus et al., 2001; Lachnik et al., 2002; Broccolo et al., 2003)。因此，本計劃的目的即是利用 Q-PCR 技術建立一個快速、敏感度高、且專一性高的 BCG 效價檢測方法。首先將冷凍乾燥的 BCG 疫苗(由低毒性之 BCG 菌株 Tokyo 172 製成) 以蒸餾水稀釋成不同濃度，再將稀釋液以羅琴二氏 (Lowenstein-Jensen) 培養液置於 37°C 恆溫培養箱中培養，並利用 Q-PCR 技術針對 Mycobacteria 的 16S ribosomal RNA (rRNA) gene 進行 DNA 的擴增及定量檢測 (Portaels, et al., 1996; Talbot et al., 1997; Deskardon et al., 1998; Okazaki et al., 2005)。本研究計畫已成功建立 BCG 菌 16S rRNA 基因 DNA 利用 Q-PCR 檢測之標準曲線，並由不同天數的 BCG 菌培養，藉由檢測 BCG 菌的生長差異，可預估出活菌的數目，相信這個研究的結果將來可以應用至 BCG 疫苗效價之分析以做為製程中管控 (in process control) 的工具。如此，不但可以節省傳統方法所耗費的時間外，更可以提供高敏感度與高專一性的先進分析方法。

二、材 料 與 方 法

一、BCG 菌的培養

冷凍乾燥的 BCG 疫苗 (由低毒性之 BCG 菌株 Tokyo 172 製成)，內含 10^8 BCG 菌，以 2.5 mL 蒸餾水稀釋後濃度成為 2 x 10^7/0.5 mL，再將菌液依照實驗所需進行進一步的稀釋，並以羅琴二氏 (Lowenstein-Jensen) 培養液置於 37°C 恆溫培養箱中培養。

二、BCG 菌 Q-PCR 技術之建立

1. 設計 BCG 16S rRNA 基因的 primers 與 probe

(1) BCG 序列搜尋：

選定 M.bovis 16S ribosomal RNA and 23S ribosomal RNA genes (ACCESSION No.：M20940) [附錄一] 之序列作為 primers 與 probe 的設計之用。

(2) primers 與 probe 的設計

primers 與 probe 的設計是利用 Primer Express 軟體 (Applied Biosystems, CA, USA), 所設計的序列分別如下：

Forward primer: 5'-GAG TGG CGA ACG GGT GAG TA-3'

Probe: FAM-5'-TGG GAA ACT GGG TCT AAT A-3’-MGB

Reverse primer: 5'-ACA TGC ATC CCG TGG TCC TA-3'

Amplicon size: 101 bp

2. BCG DNA 萃取

製備 Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0)、Solution 2 (0.2 N NaOH, 1% SDS) 與 Solution 3 (3 M KOAc, 11.5% acetic acid) 以溶解 BCG 菌的細胞壁。接著以 GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences, NJ, USA) 進行 genomic DNA 的萃取，所有步驟均依照廠商所提供的方法。最後將 DNA 以適當量的 ddH_2O elute 並儲存於 -20°C 冰箱備用。

所有 BCG DNA 萃取步驟已標準化，並列於 [附錄二] 中。

3. 測試 BCG 16S rRNA primers 與 probe

(1) 以傳統 PCR 測試 BCG 16S rRNA primers

Reagents:

Component	Volume added	Final concentration
ddH2O	9.5 μL	-
2X Oin’1 PCR master mix	12.5 μL	1X
Forward primer (10 μM)	1.0 μL	400 nM
Reverse primer (10 μM)	1.0 μL	400 nM
DNA or cDNA	1.0 μL	-
	25.0 μL	

Thermal cycle：

Initial step (Enzyme activation)	Each of 40 cycles	
	Melt	Annealing and Extension
Hold	Cycle	
95°C, 10 min	95°C, 30 sec	60°C, 1 min

PCR 產物以 2.5% agarose gel 進行分離，並加入 100-bp ladder 做為 marker。

(2) 以傳統 PCR 及 Q-PCR 試劑測試 BCG 16S rRNA primers

以 2X TaqMan Universal PCR Master Mix 取代 O'in1 PCR master mix，以如上的試藥濃度與 thermal cycle 進行 BCG 16S rRNA primers 的測試。PCR 產物以 2.5% agarose gel 進行分離，並加入 100-bp ladder 做為 marker。

(3) BCG 16S rRNA Primers 與 probe 的最適濃度測試

測試四種 primers 與 probe 的濃度組合，目標是找出最低 Ct 與最高 ΔRn 的組合

(1) Primer 200 nM/Probe 200 nM

(2) Primer 200 nM/Probe 400 nM

(3) Primer 400 nM/Probe 200 nM

(4) Primer 400 nM/Probe 400 nM

4. 建立 BCG 16S rRNA 檢測之標準曲線

將濃度為 2 x 10^7/0.5 mL 的菌液進行不同倍數的稀釋，抽取 DNA 後進行 BCG 16S rRNA Q-PCR 的檢測，以建立檢測之標準曲線

Folds of BCG DNA dilution	Concentration of BCG
10^0 X	4 x 10^5 cells/well
10^1 X	4 x 10^4 cells/well
10^2 X	4 x 10^3 cells/well
10^3 X	4 x 10^2 cells/well
10^4 X	4 x 10^1 cells/well
10^5 X	4 x 10^0 cells/well
10^6 X	4 x 10^{-1} cells/well

5. 以 BCG 16S rRNA QPCR 檢測 BCG 菌的生長

由冷凍乾燥的 BCG 疫苗稀釋不同濃度的 BCG 菌，經過二天與四天的培養，再以 BCG 16S rRNA QPCR 進行檢測，由 BCG 菌的生長差異可估算出活菌的數目。

三、結　果　與　討　論

一、BCG 16S rRNA primers 與 probe 之測試結果

(1) 以傳統 PCR 測試 BCG 16S rRNA primers

測試結果如 Figure 1 (A) 所示，PCR 產物的長度約為 100 bp，且隨著 DNA 的量減少，PCR 產物的量也減少，表示所設計的 primers 對 BCG 16S rRNA 基因具有專一性。

(2) BCG 16S rRNA Primers 與 probe 的最適濃度測試

測試四種 primers 與 probe 的濃度組合，結果發現四種濃度組合所獲得的 C_T 值相近，但是 PCR 產物的量在 primers 濃度為 400 nM 時明顯增加，而 probe 濃度則不影響ΔRn [Figure 1(B)]，因此選定 primers 濃度 400 nM 及 probe 濃度 200 nM 為最適濃度組合。

經由測試結果建立 BCG 16S rRNA 基因的 Q-PCR 檢測如下，同時此檢測步驟也標準化 [附錄二] 作為之後所有檢測之用。

Component	Volume added	Final concentration
ddH2O	7.5 μL	-
2X Oin’1 PCR master mix	12.5 μL	1X
Forward primer (10 μM)	1.0 μL	400 nM
Reverse primer (10 μM)	1.0 μL	400 nM
Probe (5 μM)	1.0 μL	200 nM
DNA	2.0 μL	-
	25.0 μL	

Thermal cycle:

Initial step (Enzyme activation)	Each of 40 cycles	
	Melt	Annealing and Extension
Hold	Cycle	
95°C, 10 min	95°C, 30 sec	60°C, 1 min

二、建立 BCG 16S rRNA QPCR 檢測之標準曲線

BCG 16S rRNA QPCR 檢測之標準曲線如 Figure 2 所示, 檢測之有效範圍為 4×10^5 cells 至 4×10^1 cells，在此偵測範圍內 Ct 值的增加與細胞的減少倍數呈現相當高的相關性 ($R^2 = 0.9998$)。

為了要確認 BCG 16S rRNA QPCR 檢測標準曲線之再現性，將不同濃度的 BCG 菌萃取 DNA，進行同樣的標準曲線實驗，Table 1 所示為五次重覆實驗的結果 ($R^2 = 0.9869$)，檢測之有效範圍位於同樣 4×10^5 cells 至 4×10^1 cells 之間，同時每一次實驗的 Ct 值差異也相當小。如果將 BCG 菌進行五倍的 serial dilutions，萃取 DNA 後再進行同樣的標準曲線實驗，則依然獲得相關性相當高的標準曲線 (Figure 3)。因此，以 BCG 16S rRNA Q-PCR 分析的確可行，同時具有相當高的再現性。

三、以 BCG 16S rRNA QPCR 標準曲線檢測已知 BCG 濃度之檢體

在確認 BCG 16S rRNA QPCR 標準曲線的可信度與再現性之後，進一

步以已知 BCG 濃度之檢體同時與 BCG 16S rRNA QPCR 標準曲線進行分析，以確認由標準曲線所求得的檢體濃度與預估的濃度相符合。

以 Figure 4 的例子說明，由標準曲線所求得的迴歸方程式為：

$$y = -0.9353x + 37.533$$

在同一次分析中放入 BCG 菌數 1×10^5、5×10^4、1×10^3 及 500 cells/well 的檢體，所得 Ct 值分別為 21.66、22.99、28.06、29.08。將這四個檢體的 Ct 值代入上列方程式，計算得 BCG 菌數分別為 128,466、50,000、1,000 及 500，與已知的菌數相當接近。也再次證實此分析方法的可信度相當高。

四、以 BCG 16S rRNA QPCR 檢測 BCG 菌的生長

BCG 菌經過不同天數的培養，以 BCG 16S rRNA Q-PCR 可以檢測出 BCG 菌的生長差異，並可預估出活菌的數目。如 Figure 5 所示，不同濃度的 BCG 菌，經過二天與四天的培養，起始濃度為 85.7×10^6 cells 與 21.4×10^6 cells 兩組實驗中，可以明顯檢測到 BCG 菌的生長 (Ct 值下降)，並進一步可以推算出活菌生長的數目。但在起始濃度為 5.36×10^6 cells 與 1.34×10^6 cells 兩組實驗中，則無法檢測出這種相關性。由此初步的結果可知，如果 BCG 的活菌的數目在 1×10^7 以上時，經過

兩天以上的培養即可檢測出其 BCG 菌的生長差異。因此，利用 BCG 16S rRNA Q-PCR 的確可以預估出活菌的數目，相信這項技術可以應用至 BCG 疫苗效價之分析以做為製程中管控 (in process control) 的工具。

四、參　考　文　獻

Barnes PF, Bloch AB, Davidson PT, Snider DE: Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1991; 324: 1644-1650.

Broccolo F, Scarpellini P, Locatelli G, Zingale A, Brambilla AM, Cichero P, Sechi LA, Lazzarin A, Lusso P: Rapid diagnosis of Mycobacterial infections and quantitation of Mycobacterium tuberculosis load by two real-time calibrated PCR assays. *J Clin Microbiol* 2003;41(10): 4565-4572.

Deskardom LE, Chen Y, Perkins MD, Teixeira L, Cave MD, Eisenach KD: Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1998:36(7): 1964-1968.

Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC: Global burden of tuberculosis esteimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA* 1999; 282:677-686.

Harder TC, Hufnagel M, Zahn K, et al.: New LightCycler PCR for rapid and sensitive quantification of parrvovirus B19 DNA guides therapeutic decision-making in relapsing infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4413-4419.

Kaufmann SHE: Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nature Med* 2002; 6:955-960.

Kochi A: The global tuberculosis infections and the new control strategy of the

Word Health Organization. *Tubercle* 1991;72:1-6.

Kraus G, Cleary T, Miller N, Seivright R, Young AK, Spruill G, Hnatyszyn HJ: Rapid and specific detection of the Mycobacterium tuberculosis complex using fluoregenic probes and real-time PCR. *Mol Cell Probes* 2001; 15:375-383.

Lachnik J, Ackermann B, Bohressen A, et al.: Rapid-cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria. *J Clin. Microbiol* 2002;40:3364-3373.

Larsen HH, Masur H, Kovacs JA, Gill V.J. et al.: Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 490-494.

Liebana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, Alemany J, Suarez G, Domingo M, Dominguez L: Simple and rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33(1): 33-36

Mangiapan G, Vokurka M, Schouls L, Cadranel J, Lecossier D, Embden J, Hance A: Sequence capture-PCR improves detection of Mycobacterial DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34(5): 1209-1215.

McAvin JC, Reilly PA, Roudabush RM, Barnes WJ, et al.: Sensitive and specific method for rapid identification of Streptococcus pneomoniae using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3446-3451.

Okazaki T, Ebihara S, Takahashi H, Asada M, Sato A, Seki M, Ohto H, Sasaki H: Multiplex PCR-Identified Cutaneous Tuberculosis Evoked by *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination in a Healthy Baby. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1):523-525.

Portaels F, Fonteyne PA, Beenhouwer HD, Rijk H, Gue´de´non A, Hayman H,

Meyers WM: Variability in 39 End of 16S rRNA Sequence of *Mycobacterium ulcerans* Is Related to Geographic Origin of Isolates. *J Clin Microbiol* 1996; 34(4): 962-965.

Raviglione MC, Snider EEJ, Kochi A: Global epidemology of tuberculosis-morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995; 273: 220-226.

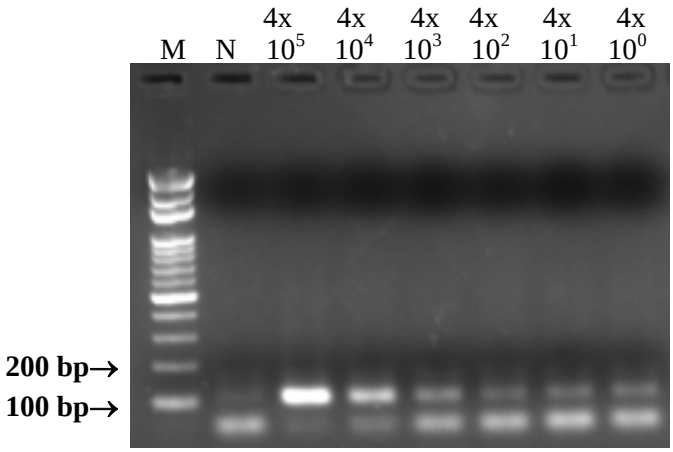
Talbot EA, Williams DL, Frothingham R: PCR Identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 1997; 566–569.

參、

圖　與　表

Figure 1. BCG 16S rRNA primers 與 probe 的測試

(A) 以傳統 PCR 測試 BCG 16S rRNA primers



(B) BCG 16S rRNA Primers 與 probe 的最適濃度測試

Primer concentration	Probe concentration	Average Ct
200 nM	200 nM	19.86
200 nM	400 nM	19.79
400 nM	200 nM	20.17
400 nM	400 nM	19.53

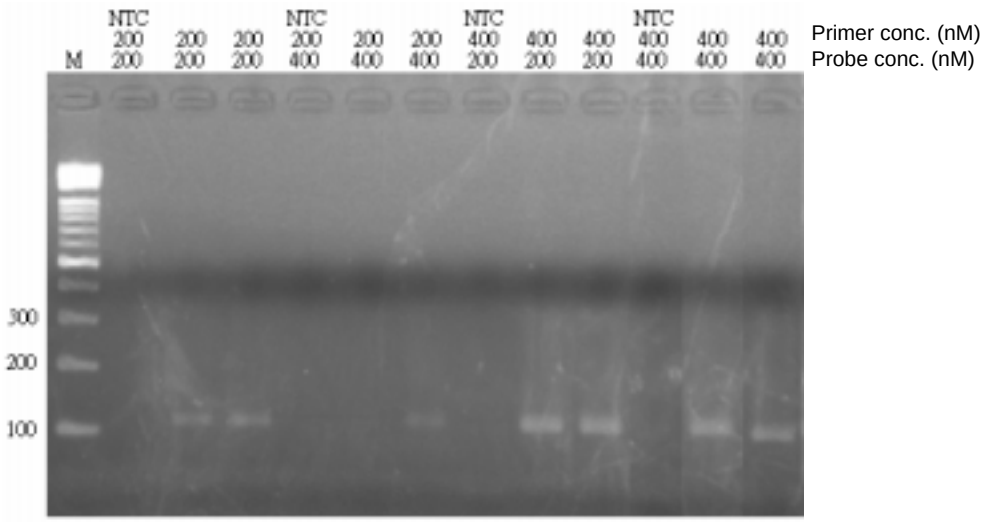
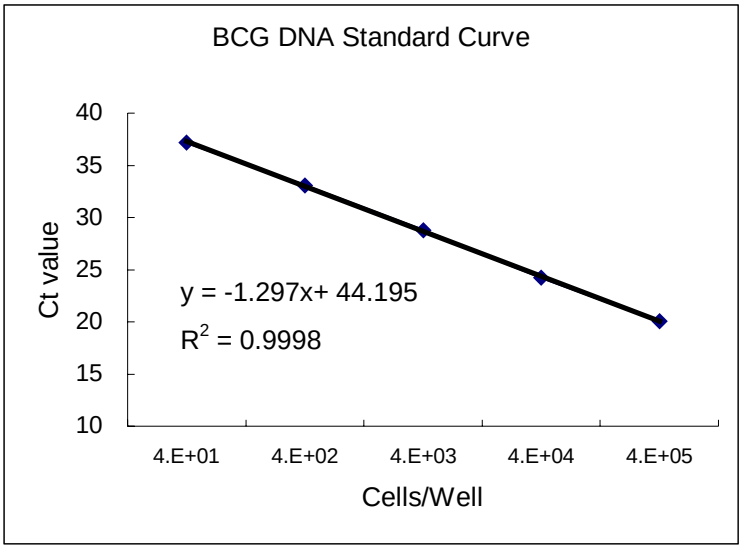


Figure 2. BCG 16S rRNA 檢測標準曲線之建立 (十倍系列稀釋)

Folds of BCG DNA dilution	Concentration of BCG	Average Ct
10^0 X	4 x 10^5 cells/well	20.05
10^1 X	4 x 10^4 cells/well	24.25
10^2 X	4 x 10^3 cells/well	28.80
10^3 X	4 x 10^2 cells/well	33.05
10^4 X	4 x 10^1 cells/well	37.20
10^5 X	4 x 10^0 cells/well	40.00
10^6 X	4 x 10^{-1} cells/well	40.00



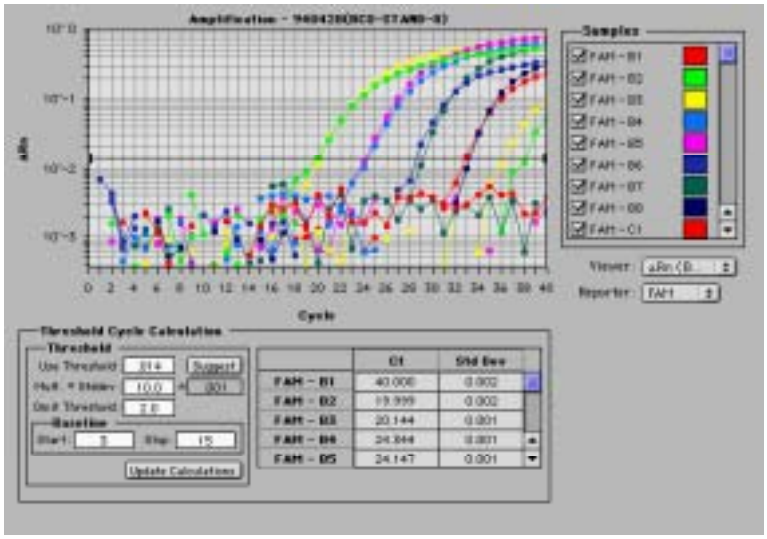
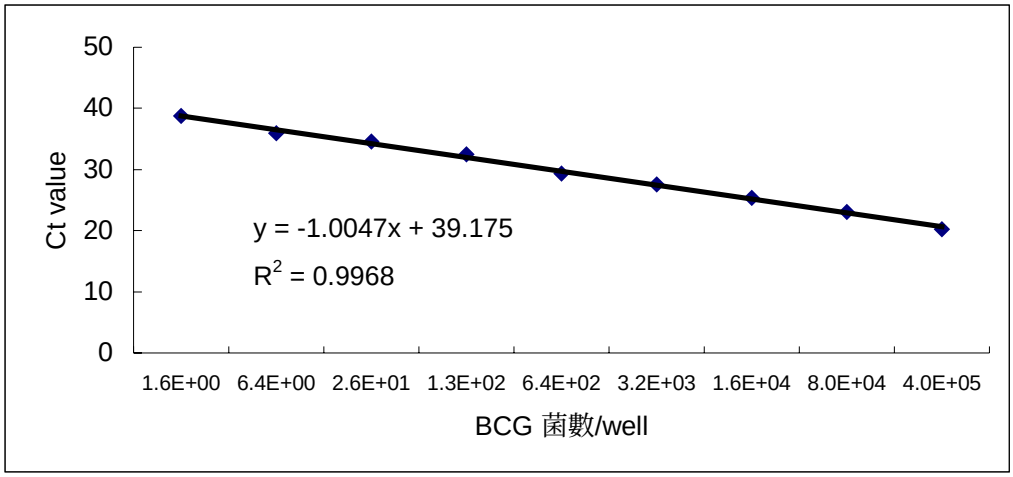


Figure 3. BCG 16S rRNA 檢測標準曲線之建立 (五倍系列稀釋)

菌數/well	Ct
400,000	20.20
80,000	23.01
16,000	25.41
3,000	27.56
640	29.33
128	32.51
25.6	34.56
6.4	35.92
1.6	38.81



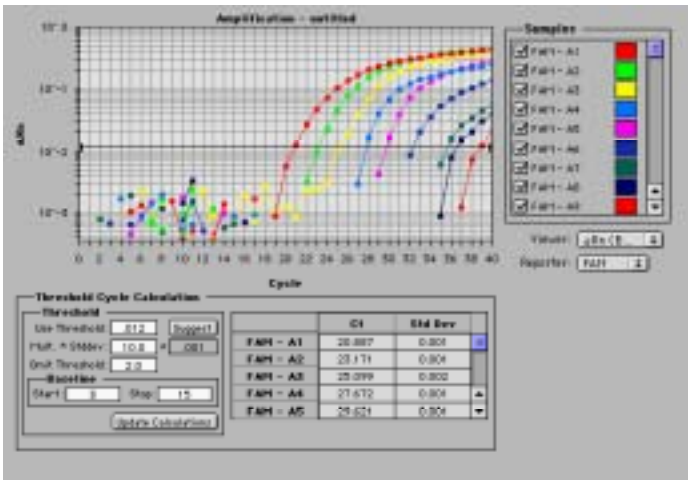
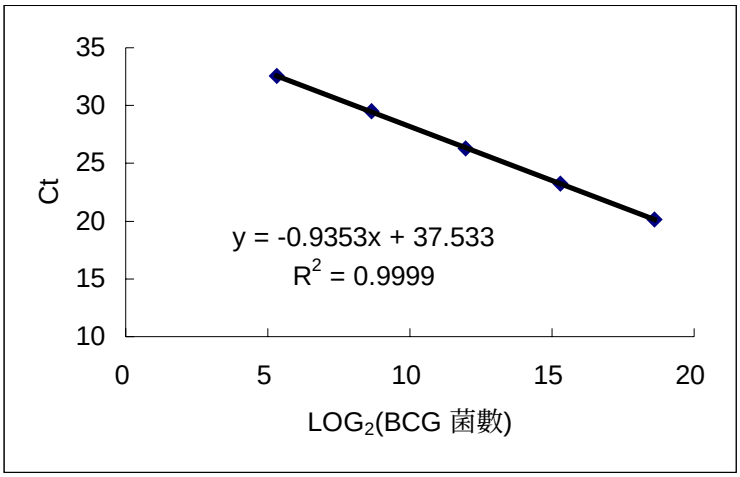


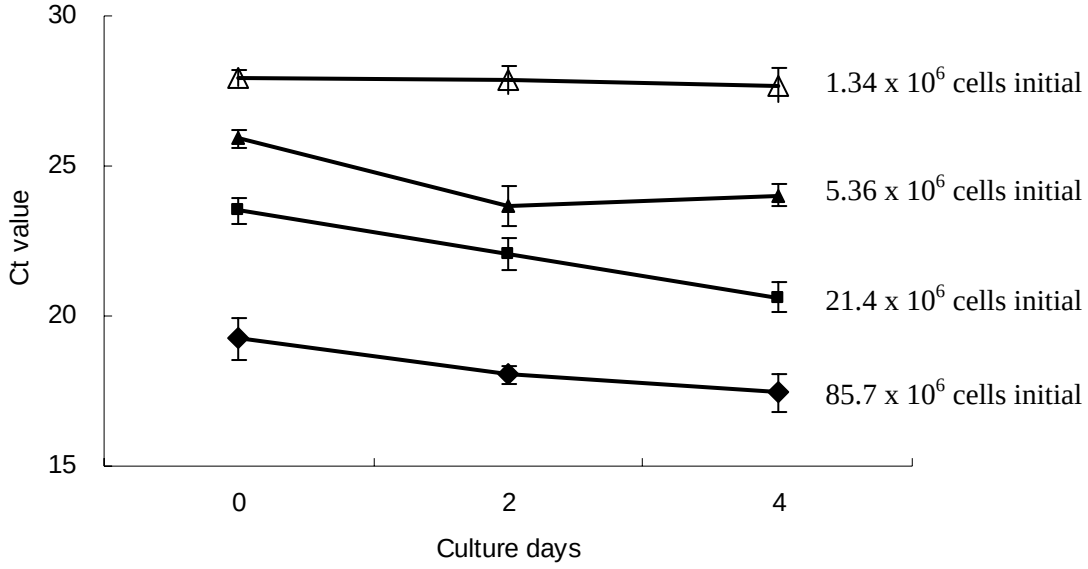
Figure 4. 以 BCG 16S rRNA Q-PCR 標準曲線檢測已知 BCG 濃度的檢體

BCG 菌數/well	LOG_2 (BCG 菌數) (x)	Ct 值 (y)
4×10^5	23.25	20.14
4×10^4	19.93	23.25
4×10^3	16.61	26.28
4×10^2	13.29	29.51
4×10^1	9.97	32.54



Ct 值	由標準曲線計算之菌數	預期之菌數
21.66	128,466	100,000
22.99	47,943	50,000
28.06	1,119	1,000
29.08	526	500

Figure 5. 以 BCG 16S rRNA QPCR 檢測 BCG 菌的生長。不同濃度的 BCG 菌，經過不同天數的培養，可以檢測出 BCG 菌的生長差異，並進一步可以推算出活菌生長的數目。



	Initial BCG cell numbers			
Culture days	85.7×10^6	21.4×10^6	5.36×10^6	1.34×10^6
0	19.26 ± 0.70	23.51 ± 0.44	25.92 ± 0.31	27.92 ± 0.27
2	18.05 ± 0.31	22.06 ± 0.56	23.67 ± 0.39	27.84 ± 0.46
4	17.46 ± 0.63	20.63 ± 0.49	24.02 ± 0.35	27.69 ± 0.56

Table 1. BCG 16S rRNA 檢測標準曲線具有相當高的再現性

菌數	Repeat 1 (Ct)	2 (Ct)	3 (Ct)	4 (Ct)	5 (Ct)	Mean Ct	SD
4×10^{5}	20.58	20.63	20.67	20.21	20.21	20.46	0.23
4×10^{4}	24.71	24.81	25.07	24.62	24.68	24.78	0.18
4×10^{3}	28.37	28.60	28.00	28.27	28.14	28.28	0.23
4×10^{2}	31.23	31.28	30.50	29.68	29.51	30.44	0.83
4×10^{1}	33.23	33.58	34.44	34.60	32.40	33.65	0.90
4×10^{0}	35.01	36.72	28.67	34.04	37.78	34.44	3.54
4×10^{-1}	35.69	38.59	40.00	37.89	33.48	37.13	2.57
4×10^{-2}	38.27	40.00	37.80	39.17	38.51	38.75	0.86
4×10^{-3}	37.80	37.76	40.00	36.13	35.86	37.51	1.66
4×10^{-4}	36.29	36.92	40.00	36.80	32.19	36.44	2.79
4×10^{-5}	37.78	37.31	39.26	39.79	36.75	38.18	1.30

肆、

附　錄

附錄一、DNA sequence of BCG 16S ribosomal RNA gene

```
LOCUS       MSGTGDA                 2016 bp    DNA     linear   BCT
26-APR-1993
DEFINITION  M.bovis 16S ribosomal RNA and 23S ribosomal RNA genes.
ACCESSION   M20940
VERSION     M20940.1  GI:150001
KEYWORDS    16S ribosomal RNA; 23S ribosomal RNA; ribosomal RNA.
SOURCE      Mycobacterium bovis
  ORGANISM  Mycobacterium bovis
            Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
            Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium; Mycobacterium
            tuberculosis complex.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2016)
  AUTHORS   Suzuki,Y., Nagata,A., Ono,Y. and Yamada,T.
  TITLE     Complete nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of Mycobacterium
            bovis BCG
  JOURNAL   J. Bacteriol. 170 (6), 2886-2889 (1988)
   PUBMED   3286624
COMMENT     Original source text: M.bovis (strain BCG) DNA, clone pBCG4.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2016
                     /organism="Mycobacterium bovis"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:1765"
     rRNA            101..1635
                     /product="16S ribosomal RNA"
     rRNA            1912..>2016
                     /product="23S ribosomal RNA"
ORIGIN      191 bp upstream of XhoI site.

        1 ccatgctctt gatgccccgt tgtcgggggg cgtggccgtt tgttttgtca ggatatttct
       61 aaataccttt ggctcccttt tccaaaggga gtgtttgggt tttgtttgga gagtttgatc
      121 ctggctcagg acgaacgctg gcggcgtgct taacacatgc aagtcgaacg gaaaggtctc
      181 ttcggagata ctcgagtggc gaacgggtga gtaacacgtg ggtgatctgc cctgcacttc
      241 gggataagcc tgggaaactg ggtctaatac cggataggac cacgggatgc atgtcttgtg
      301 gtggaaagcg ctttagcggt gtgggatgag cccgcggcct atcagcttgt tggtggggtg
```

```
 361 acggcctacc aaggcgacga cgggtagccg gcctgagagg gtgtccggcc acactgggac
 421 tgagatacgg cccagactcc tacgggaggc agcagtgggg aatattgcac aatgggcgca
 481 agcctgatgc agcgacgccg cgtgggggat gacggccttc gggttgtaaa cctctttcac
 541 catcgacgaa ggtccgggtt ctctcggatt gacggtaggt ggagaagaag caccggccaa
 601 ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag ggtgcgagcg ttgtccggaa ttactgggcg
 661 taaagagctc gtaggtggtt tgtcgcgttg ttcgtgaaat ctcacggctt aactgtgagc
 721 gtgcgggcga tacgggcaga ctagagtact gcaggggaga ctggaattcc tggtgtagcg
 781 gtggaatgcg cagatatcag gaggaacacc ggtggcgaag gcgggtctct gggcagtaac
 841 tgacgctgag gagcgaaagc gtggggagcg aacaggatta gataccctgg tagtccacgc
 901 cgtaaacggt gggtactagg tgtgggtttc cttccttggg atccgtgccg tagctaacgc
 961 attaagtacc ccgcctgggg agtacggccg caaggctaaa actcaaagga attgacgggg
1021 gcccgcacaa gcggcggagc atgtggatta attcgatgca acgcgaagaa ccttacctgg
1081 gtttgacatg cacaggacgc gtctagagat aggcgttccc ttgtggcctg tgtgcaggtg
1141 gtgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca
1201 acccttgtct catgttgcca gcacgtaatg gtggggactc gtgagagact gccggggtca
1261 actcggagga aggtggggat gacgtcaagt catcatgccc cttatgtcca gggcttcaca
1321 catgctacaa tggccggtac aaagggctgc gatgccgcga ggttaagcga atccttaaaa
1381 gccggtctca gttcggatcg gggtctgcaa ctcgaccccg tgaagtcgga gtcgctagta
1441 atcgcagatc agcaacgctg cggtgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca
1501 cgtcatgaaa gtcggtaaca cccgaagcca gtggcctaac cctgggaggg agctgtcgaa
1561 ggtgggatcg gcgattggga cgaagtcgta acaaggtagc cgtaccggaa ggtgcggctg
1621 gatcacctcc tttctaagga gcaccacgaa aacgccccaa ctggtggggc gtaggccgtg
1681 aggggttctt gtctgtagtg ggcgagagcc gggtgcatga caacaaagtt ggccaccacc
1741 acactgttgg gtcctgaggc aacactcgga cttgttccag gtgttgtccc accgccttgg
1801 tggtgggggt gtggtgtttg agaactggat agtggttgcg agcatcaatg gatacgctgc
1861 cggctagcgg tggcgtgttc tttgtgcaat attctttggt ttttgttgtg tttgtaagtg
1921 tctaagggcg catggtggat gccttggcat cgagagccga tgaaggacgt gggaggctgc
1981 gatatgcctc ggggagctgt caaccgagcg tggatc
//
```

附錄二、

SOP for

BCG DNA Real-Time Quantitative PCR

1. DNA Extraction (GEX Genomic DNA Purification kit)
2. Real-time Quantitative PCR (ABI 7700)

1. DNA Extraction (GEX Genomic DNA Purification kit)

Sample：BCG (1×10^7 cells; lyophillized)

Reagents and materials：

(1) Solution I

50 mM	Glucose
25 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM	EDTA (pH 8.0)

(2) Solution II

0.2 N	NaOH
1%	SDS

(3) Solution III

5 M	KOAC	60 mL
	Glacial Acetic acid	11.5 mL
	ddH_2O	28.5 mL

(4) GEX Genomic DNA Purification Kit

(5) Centrifuge (high speed for eppendorf tubes)

(6) Heat block

(7) ddH_2O

Procedures：

(1) BCG cells 250 µL (1×10^7 cell)
(2) Add100 µL Solution I, vortex, mix well
(3) Add 200 µL Solution II, mix well (do not vortex)
(4) Stand at room temperature for 2 min
(5) Add 150 µL Solution III, mix well
(6) Put on ice for 5 min
(7) Centrifuge at 13,200 rpm, 4°C, for 10 min
(8) Transfer supernatant to a new 1.5-mL eppendorf tube
(9) Add 500 µL Extraction buffer, vortex
(10) Stand at room temperature for 10 min (vortex every 2 min)
(Heat miniQ to 70°C for DNA elution)
(11) Transfer sample to a new GEX tube (500 µL x 2)
(12) Centrifuge at 8,000 rpm, 1 min
(13) Add 500 µL Extraction to column
(14) Centrifuge at 8,000 rpm, 1 min
(15) Add 500 µL Wash Solution
(16) Centrifuge at full speed (13,200 rpm) for 3 min
(17) Add 50 µL miniQ (pre-heated to 70°C)
(18) Centrifuge at full speed (13,200 rpm) for 1 min
(19) Store the eluent at -20°C until use

2. Real time PCR (ABI 7700)

Sample：BCG DNA

Reagents and instruments：

(1) 2 X TaqMan PCR Universal Master Mix

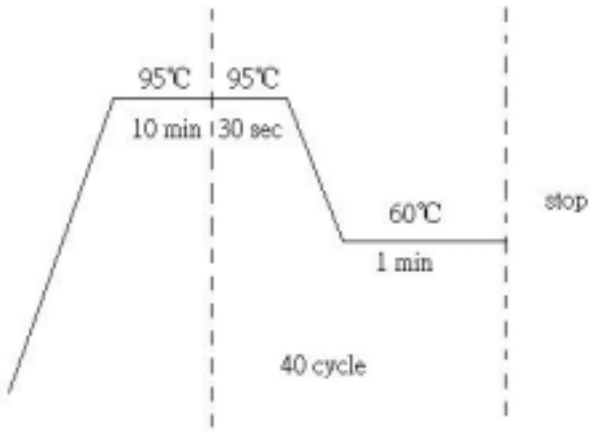
(2) TaqMan Probe (BCG-16S rRNA gene)

(3) Primers (BCG-16S rRNA)

(4) ABI 7700 Sequence Detection System

Procedures：

(1) Set up the following reagents:

Reagents	Concentration	Volume added	Final conc.
DNA	-	2.0 μL	-
Primer Forward	10 μM	1.0 μL	400 nM
Primer Reverse	10 μM	1.0 μL	400 nM
TaqMan Probe	10 μM	0.5 μL	200 nM
2X TaqMan Universal PCR Master Mix	2X	12.5 μL	1X
ddH_2O		8.0 μL	-
Total		25.0 μL	

(2) Set the thermal condition as following: