

腸内細菌遺伝子検出キット —高速蛍光検出—

(Code No.FIK-311)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A5205K

— 目 次 —

[1] はじめに	2
[2] 製品内容	3
[3] 製品のほかに用意するもの	4
[4] 検出される菌種と検出される遺伝子	4
[5] 使用方法	5
[6] 判定	7
[7] トラブルシューティング	9
[8] 関連商品	10

ご注意

本製品に含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断および臨床検査には使用しないでください。本製品は臨床診断薬ではありません。本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

[1] はじめに

本製品は、食中毒原因菌として知られるサルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌をマルチプレックス PCR 法、融解曲線解析により検出するキットです。本製品を用いることにより、50 個の検便検体をプールした場合でも培養法と同等以上の感度で検出することが可能です。

プール・マルチプレックス PCR 法による検便検査のスクリーニングのご提案

調理従事者などを対象とする健康保菌者の抽出を目的とした検便検査の場合、その陽性率は 0.1%以下であり、大部分が陰性です。このような場合、検体をプールしてスクリーニングを行い、大部分の陰性検体をまとめて判定することが有効です。スクリーニングで陽性となったプールについて個別の検体を培養法で検査し、陽性検体を判定します。本製品は、50 個までのプール検体であれば、培養法と同等以上の感度で検出することが可能であり、検査の精度に影響を及ぼしません。

本製品の特長

(1)塗抹培養の検体数を 10 分の 1 以下に低減できます。

本製品を用いたスクリーニングにより 90～95%程度の陰性検体を判定できますので、培養法の検体数を約 10 分の 1 以下に低減できます。

(2)解析時間が大幅に短縮されました。

弊社姉妹品である腸内細菌遺伝子検出キット-マルチ PCR-(コード:FIK-101)、腸内細菌遺伝子検出キット-蛍光検出-(コード:FIK-301)と比較して、解析時間が大幅に短縮されました。本製品は約1時間で解析が完了するため、迅速な陰性判定が行えます。

(3)判定が簡便になります。

本製品は、ピークの検出により判定を行います。そのため、コロニーの色や形状による判定に比べ簡便に行えます。ピークの判定をパソコンで行うソフトウェアをご用意しておりますので、詳細は弊社テクニカルラインまでお問い合わせください。

ご注意

(1)本製品を診断および臨床検査には使用しないでください。本製品は臨床診断薬ではありません。

(2)本製品を用いてスクリーニングを行う際の検体のプール数の上限は 50 検体です。この検体数上限は本製品の検出感度をもとに最適化されたものです。50 検体を超えるプール数でのスクリーニングは行わないでください。

(3)本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれています。

品名および内容	保存	容量
PCR Master Mix	-20°C 遮光保存	9.54ml (1.59ml × 6)
10 × Primer Mix	-20°C	1.2ml
ウラシル DNA グリコシラーゼ(UNG)	-20°C	60μl

PCR Master Mix

- ・反応バッファー、EvaGreen[®]、dNTPs、Mg²⁺、DNA ポリメラーゼ及び、抗 DNA ポリメラーゼ抗体などを含むプレミックス溶液です。
- ・本製品に含む EvaGreen[®]は米国 Biotium Inc.の製品です。東洋紡は Biotium Inc.との契約のもと本製品を販売しておりますので、お客様でのライセンス契約は必要ありません。

10 × Primer Mix

- ・サルモネラ(invA 遺伝子)、腸管出血性大腸菌(VT 遺伝子)、赤痢菌(ipaH 遺伝子)をマルチプレックスで増幅できるプライマーを含んでいます。
- ・PCR の阻害による偽陰性を回避するために、内部標準コントロール DNA および内部標準コントロール増幅用プライマーを含んでいます。

ウラシル DNA グリコシラーゼ (UNG)

- ・キャリアオーバー汚染した増幅産物を分解することが可能なウラシル DNA グリコシラーゼ(UNG)を含みます。
- ・キャリアオーバー汚染とは、PCR で生成した増幅産物を次回以降の PCR 反応液に混入してしまうことです。混入した増幅産物を鋳型として増幅が起こるため、偽陽性の原因となります。本製品では、UNG により、10³~10⁴copy/反応程度の混入した増幅産物を分解し、偽陽性を防止することが可能です。

本製品の保存、使用について

- ・製品到着後は、-20°C で保存してください。
- ・使用時は、融解させた後、ゆるやかに転倒混和し、溶液を完全に均質化した上でご使用ください。
- ・使用後は、再度凍結して保管してください。10 回程度の凍結融解の繰り返しは、品質に影響がないことを確認しています。
- ・PCR Master Mix については、蛍光色素である EvaGreen[®]を含みます。EvaGreen[®]の蛍光減衰を防ぐため、保存の際は遮光してください。
- ・PCR Master Mix、10 × Primer Mix、UNG を混合した PCR 反応液は当日中の使用が可能です。4°Cで 48 時間の保管後にも、品質に影響がないことを確認しています。

[3] 製品のほかに用意するもの

本製品の他に、以下の試薬・機器類をご用意ください。

品名	推奨使用
リアルタイム PCR 装置	
ヒートブロック	1.5ml チューブを 95°C 以上の加熱処理が可能なもの
遠心分離機	12,000rpm が可能なもの
スピンドウン用小型遠心機	
竹串	滅菌済みのもの
5ml チューブ	キャップ付のもの
PCR 用プレートまたはチューブ	リアルタイム PCR 装置専用のプレート、またはチューブ
1.5ml チューブ	
マイクロピペット	
チップ	フィルター付のもの
滅菌水	

[4] 検出される菌種と検出される遺伝子

菌種	遺伝子	推奨使用
サルモネラ	invA	血清型の判定はできません
腸管出血性大腸菌	VT1, VT2, VT2vha, VT2vhb, VT2vp1	血清型の判定はできません
赤痢菌	ipaH	ipaH をもつ腸管侵入性大腸菌も検出します

[5] 使用方法

糞便検体はキャリブレア培地採便管に採取されたものを使用します。

(1) 糞便検体の懸濁液の作製

下記 A, B いずれかの方法でプール懸濁液を作製します。

A 検体ごとに懸濁液を作製してからプールする方法

- 1) 1.5ml チューブに滅菌水 50 μ l をとります。
- 2) 採便管から採便棒を抜き、チューブに浸し、1-2 秒激しくボルテックスします。
- 3) 懸濁液を 10 μ l ずつ 50 本分プールします。
(糞便検体を直接プールしないでください)

B ひとつの液に多数の糞便検体を懸濁してプールする方法

- 1) 5ml チューブに滅菌水 2.5ml をとります。
- 2) 採便管から採便棒を抜き、採便管に竹串を挿し、2-3 回上下します。
- 3) 竹串をチューブに挿し、2-3 回上下します。
- 4) 50 個の検体について、新しい竹串を使いながらひとつのチューブに懸濁していきます。
- 5) チューブにふたをし、2-3 回転倒混和します。
- 6) 0.5ml を新しい 1.5ml チューブに移します。

(2) 加熱処理、遠心分離

- 1) 1.5ml チューブに入った懸濁液(プールした懸濁液)を 95 $^{\circ}$ C 5min 加熱します。
- 2) 12,000rpm \times 3 分間 遠心分離します。
- 3) 遠心上清 2 μ l を処理済懸濁液として使用します。

- ・加熱処理済懸濁液は PCR 反応液を調製するまでは 4 $^{\circ}$ C 以下で保存してください。
- ・作製当日に PCR を行わない場合は凍結してください。数日間凍結保存可能ですが、お早めにご使用ください。
- ・加熱処理をしていない懸濁液は保存できません。

(3) PCR 反応液の調製

- 1) 凍結している試薬を完全に融解します。
- 2) 泡立てない様にながら、転倒混和にて十分に攪拌します。
- 3) 軽くスピンドウンしてキャップの裏についている試薬を落とします。
- 4) 1 反応あたり以下の分量が必要となります。必要反応数の 1 割増し程度で PCR 反応液を調製します。

	使用量(1 反応分)
PCR Master Mix	15.9 μ l
10 \times Primer Mix	2.0 μ l
UNG	0.1 μ l
合計液量	18.0 μ l

- 5) PCR 反応液を 18 μ l ずつ、リアルタイム PCR 反応プレートまたは、チューブに分注します。
- 6) 処理済糞便懸濁液の上清を 2 μ l ずつ添加します。

(4) PCR、融解曲線解析

リアルタイム PCR 装置にて以下のサイクル条件で PCR、融解曲線解析を行います。

ステップ		温度	時間
初期変性		94°C	20 秒
PCR (40 cycles)	変性	94°C	2 秒
	アニーリング	50°C	5 秒
	伸長	68°C	5 秒
融解曲線解析		60°C~90°C (0.5°C/step)	

*サイクル条件について

上記サイクルが適用できることを Bio-Rad CFX96 Touch™ Deep Well リアルタイム PCR 解析システムにて確認しています。使用するリアルタイム PCR 装置によって、サイクル条件が異なる場合がありますので、詳細は弊社テクニカルラインまでお問い合わせください。

*融解曲線解析のデータ収集ポイントについて

使用する機器によっては、融解曲線にがたつきが見られることがあります。その場合は、データ収集ポイントを 0.3°C/step に変更することで改善することがあります。その場合は、融解曲線解析のみ再度行ってください。

[6] 判定

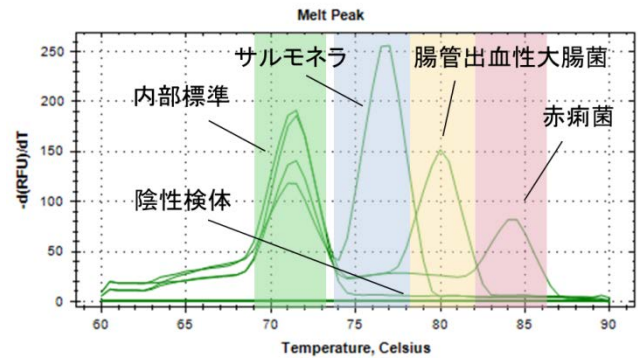
判定をパソコンで行うソフトウェアをご用意しております。詳細は弊社テクニカルラインまでお問い合わせください。

(1) ピーク検出温度

本製品では、以下の表に示すピーク温度範囲において、内部標準ピークと陽性ピークが検出されます。検出されたピークの温度 (T_m 値) によって判定します。

	ピーク温度 [※]
内部標準	69.0°C < T_m 値 ≤ 73.0°C
サルモネラ	74.0°C < T_m 値 ≤ 78.0°C
腸管出血性大腸菌	78.0°C < T_m 値 ≤ 82.0°C
赤痢菌	82.0°C < T_m 値 ≤ 86.0°C

※温度値は Bio-Rad CFX96 Touch™ Deep Well リアルタイム PCR 解析システムでの測定値です。機種によっては値が前後する場合があります。



(2) 検査結果

内部標準、3 菌種のピークの有無によって判定します。

内部標準	サルモネラ 腸管出血性大腸菌 赤痢菌	検査結果と次工程
陽性	陰性	陰性判定。 ここで検査は終了となります。
陽性	陽性	陽性判定 [※] 。 プールに含まれる個々の検体を塗抹培養します。
陰性	陽性	陽性判定 [※] 。 検出対象遺伝子の増幅が優勢で、内部標準の増幅が確認できない場合があります。この場合は陽性と判定します。 プールに含まれる個々の検体を塗抹培養します。
陰性	陰性	判定不能（反応が進行していません）。 極端に糞便の量が多い、あるいは多量のキャリーオーバー汚染などが原因で反応が進行しない場合があります。 (1) 加熱済み懸濁液を滅菌水で 2 倍程度に希釈し再検査 (2) プールに含まれる個々の検体を塗抹培養 のいずれかの処置をとります。

※サルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌のピークが検出された場合は、当該菌種が陽性となりますが、ピークが検出されなかった菌種については陰性であると判定することができません。マルチプレックス PCR の場合、2 菌種以上がプール液に含まれた場合に、増幅の優劣により一部の菌種のピークしか検出できない場合があります。この理由より、陽性ピークが検出された場合は、次工程の塗抹培養は、CT-SMAC と SS 培地の両者に塗抹培養してください。

(3)ピークの定義

ピークがあると判断するためには、ベースラインの設定が必要となります。以下の表に示す温度の点を結んだ直線がベースラインとなり、このベースラインよりも上に凸のシグナルがある場合にピークがあると判断します。

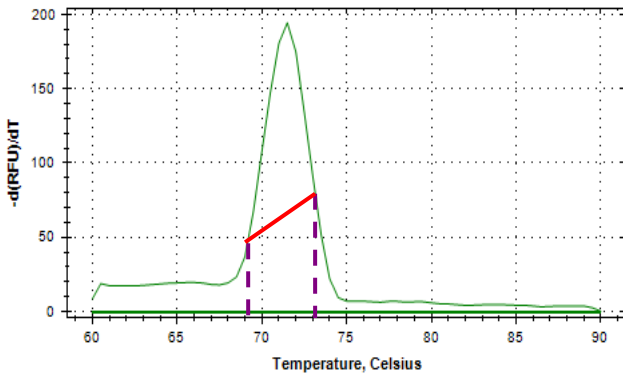
陽性判定については、このピークが、(1)ピーク検出温度に示す温度範囲内に含まれる否かで判定します。

	温度域
内部標準	69.0°C~73.0°C
サルモネラ	74.0°C~82.5°C
腸管出血性大腸菌	73.5°C~85.0°C
赤痢菌	73.0°C~87.0°C

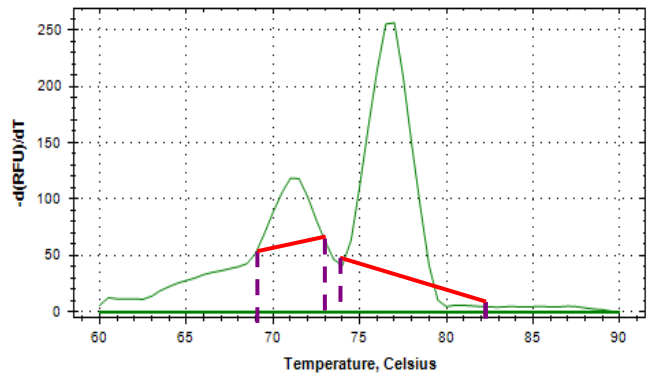
※温度値は Bio-Rad CFX96 Touch™ Deep Well リアルタイム PCR 解析システムでの測定値です。機種によっては値が前後する場合があります。

●融解曲線解析の例

内部標準
Melt Peak

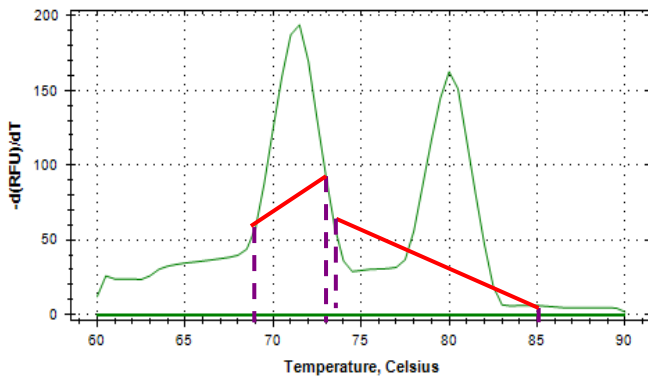


サルモネラ
Melt Peak



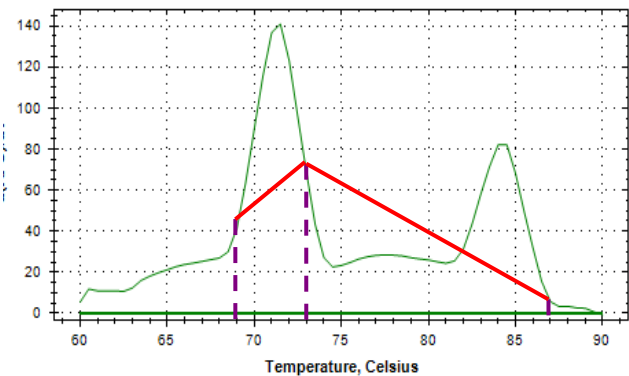
腸管出血性大腸菌

Melt Peak



赤痢菌

Melt Peak



[7] トラブルシューティング

現象	原因	対策
判定不能になる	糞便の量が極端に多い	検体懸濁液を更に 10 倍程度滅菌水等で希釈してご使用ください。
ピークが出ない	加熱処理が不十分	ヒートブロックの温度、加熱時間をご確認ください
	遠心分離が不十分	遠心後、沈殿が不十分の場合は、遠心分離の時間を延長してください。
	PCR 反応液を長期間放置した	調製後の PCR 反応液は 4°C で保存の上、当日中にご使用ください。
	キャリアオーバー汚染	上記の対策でも解決しない場合は、キャリアオーバー汚染が発生している可能性があります。試薬・水を廃棄後、汚染除去作業(拭き取り、UV 照射等)を実施してください。
融解曲線解析の波形が乱れる	融解曲線解析のデータ収集ポイントの間隔が広い	融解曲線解析のデータ収集ポイントの間隔を狭めます。目安として、0.3°C/step 以下に変更してください。
陰性コントロールが陽性になる	反応液への培養液(糞便液)の持込量が多い	反応液への培養液(糞便液)の持込量が極端に多い場合は、非特異増幅が発生する場合があります。検体懸濁液を更に 10 倍程度滅菌水等で希釈してご使用ください。
すべての検体が陽性になる	キャリアオーバー汚染	キャリアオーバー汚染が発生している可能性があります。試薬・水を廃棄後、汚染除去作業(拭き取り、UV 照射等)を実施してください。

[8] 関連商品

品名	包装	Code No.
腸内細菌遺伝子検出キットーマルチ PCRー	500 反応	FIK-101
腸内細菌遺伝子検出キットー蛍光検出ー	480 反応	FIK-301
ノロウイルス検出キット G1	100 反応	FIK-201
ノロウイルス検出キット G2	100 反応	FIK-202
ノロウイルス検出キット G1/G2ー融解曲線解析ー	100 反応	FIK-203
ノロウイルス検出キット G1/G2ープローブ検出ー	100 反応	FIK-213

Label License Statement

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

This product is provided under an Agreement between Biotium and TOYOBO. The manufacture, use, sale, offer for sale, or import of this product is subject to one or more patents or pending applications owned or licensed by Biotium, Inc. (U.S. Patent Nos. US7,803,943 B2, US7,776, 567 B2, Japan Patent No. 5249013). The purchase price of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under U.S. Patent Nos. US7,803,943 B2, US7,776, 567 B2, Japan Patent No. 5249013 and corresponding patent claims outside of the United States, to use only the purchased amount of the product and components of the product solely for the buyer's own internal research (whether the buyer is an academic or for-profit entity), in a manner consistent with the accompanying product literature. No right to use, sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party, or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for any other purpose or a Commercial Purpose, is hereby granted expressly, by implication or by estoppel. Commercial Purpose means any activity by a party for consideration and include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service including without limitation, reporting information or data resulting from use of the product or a its components for a fee or other commercial consideration; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. For products that are subject to multiple limited use label licenses, the most restrictive terms apply. This product is for research use only. Diagnostic uses require a separate license from Biotium, Inc. For information on purchasing a license to this product including for purposes other than research, contact Director of Licensing, Biotium, Inc., 3159 Corporate Place, Hayward, CA 94545, Tel: +1-(510) 265-1027. Fax: +1-(510) 265-1352. Email: btinfo@biotium.com. All names containing the designation® are trademarks of Biotium.

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

◆東洋紡ライフサイエンス事業部ウェブサイト◆

<http://www.toyobo.co.jp/bio>



【製造・販売元】

— 納期・注文に関するお問い合わせ —

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (東京)
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

— 製品の内容・技術に関するお問い合わせ —

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00 , 13:00~17:00 (土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>