

腸内細菌遺伝子検出キット —蛍光検出—

(Code No.FIK-301)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A5069K

— 目 次 —

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

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、赤痢菌の遺伝子をマルチプレックス PCR にて増幅し、EvaGreen[®] 蛍光色素を用いる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

サルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌による食中毒予防のため、大量調理施設では調理従事者を対象とした検便検査を定期的に行うことが義務づけられています。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。検体をプールすると、陽性検体は陰性検体により希釈されますが、本製品は、50 個までの検便検体をプールした検体であれば、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。

プール・マルチプレックス PCR 法を行う利点

(1) 検査当日に 90～95%程度の陰性検体を判定できます。

本製品を用いたスクリーニングは数時間で完了できますので、検査当日に 90～95%程度の陰性を判定することができます。陽性となったプールに含まれる検体は、個別に培養法にて検査し陽性検体を判定します。

(2) 塗沫培養の検体数を 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では、90～95%程度の陰性検体を判定できますので、培養法で検査する検体数を約 10 分の 1 以下に低減できます。

(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。

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。本製品では、PCR 480 回分、50 検体プール時、検便検体 24,000 検体を処理可能です。

品名および内容	ラベルの色	保存	容量
PCR Master Mix	水色	-20°C 遮光保存	9.54ml (1.59ml × 6)
10 × Primer Mix	橙色	-20°C	1.2ml
ウラシル DNA グリコシラーゼ (UNG)	灰色	-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.が特許を保有しています。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、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、再度凍結して保存してください。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。

[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	推奨仕様
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 の遠心が可能なもの
スピンドウン用小型遠心機	
竹串	
5.0ml 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	備考
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リ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、1)のチューブに浸し、1~2 秒激しくボルテックスします。
- 3) 懸濁液を 10 μ l ずつ新しい 1.5ml チューブ 1 本に集め、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)
- 4) チューブのふたを閉め、2~3 回転倒混和、または軽くボルテックスします。

※50 検体に満たない場合は、プール液の全量が 500 μ l になるように、3)のプールした液に滅菌水を加えてください。

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) 5.0ml 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 1)のチューブに挿し、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 1 本のチューブに懸濁していきます。
- 5) チューブのふたを閉め、2~3 回転倒混和、または軽くボルテックスします。
- 6) 5)の懸濁液 500 μ l 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 5 分間加熱します。
- 2) 12,000rpm \times 3 分間 遠心分離します。
- 3) 遠心上清 2 μ l を加熱処理済糞便懸濁液として使用します。

- ・作製当日に PCR を行わない場合は凍結して保存してください。数日間凍結保存可能ですが、お早めにご使用ください。
- ・使用する際は、融解後、遠心分離(12,000rpm \times 3 分間)を行い、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) 泡立でない様にしながら、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 割増し程度でマスターミックスを調製します。

	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) マスターミックスを 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) 加熱処理済糞便懸濁液 (P.4) 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
UNG 反応		20°C	10 分
初期変性		94°C	2 分
PCR* ¹ (40 cycles)	変性	94°C	10 秒
	アニーリング	55°C	15 秒
	伸長	68°C	30 秒
融解曲線解析	60°C~90°C * ²		

*¹ 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 MiniOpticonTM、Applied Biosystems[®] StepOnePlusTM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。

*² 融解曲線解析のデータ収集ポイントについて

融解曲線解析のデータ収集ポイントは、使用するリアルタイム PCR 装置によって異なります。Bio-Rad MiniOpticonTMでは、0.5°C/step、Applied Biosystems[®] StepOnePlusTMでは、0.3°C/step に設定してください。

融解曲線にがたつきが見られた場合は、データ収集ポイントを狭める(0.3°C/step 以下)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

(1) ピーク検出温度

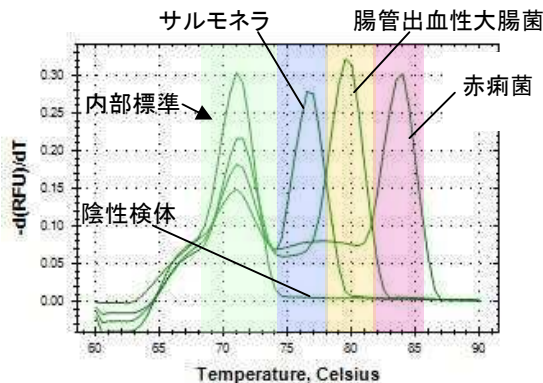
本製品では、以下の表に示すピーク温度範囲において、内部標準ピークと陽性ピークが検出されます。検出されたピークの温度(Tm 値)によって菌種を判定します。

	ピーク温度※
内部標準	69.0°C < Tm 値 ≤ 73.0°C
サルモネラ	73.5°C < Tm 値 ≤ 77.5°C
腸管出血性大腸菌	78.0°C < Tm 値 ≤ 81.5°C
赤痢菌	81.5°C < Tm 値 ≤ 85.5°C

※温度値は MiniOpticon™ (Bio-Rad 社) での測定値です。

機種によって Tm 値が前後する場合があります。この場合は、内部標準の Tm 値を算出し、71°C との温度差分、平行移動した値をピーク温度としてください。

(一部の機種では、平行移動ではない場合もあります。)



(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ア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)加熱処理済糞便懸濁液を滅菌水で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、いずれの菌種も検出できる培地に塗抹培養することをお勧めします。

(3)ピークの定義

ピークがあると判断するために、ベースラインを設定します。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。

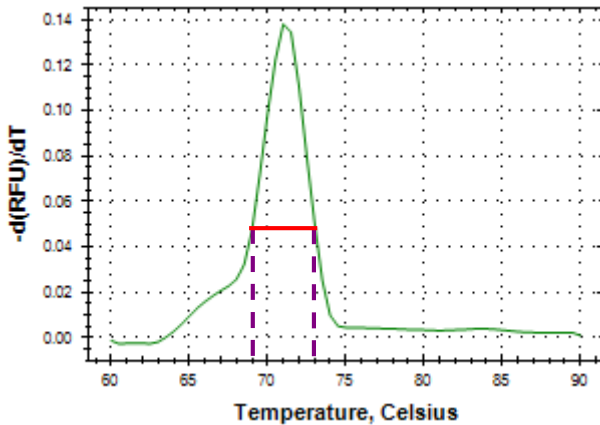
陽性判定は、このピークが前述の「(1)ピーク検出温度」に示す温度範囲内に含まれるか否かで判定します。

	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 ~82.0°C
赤痢菌	73.0°C ~87.0°C

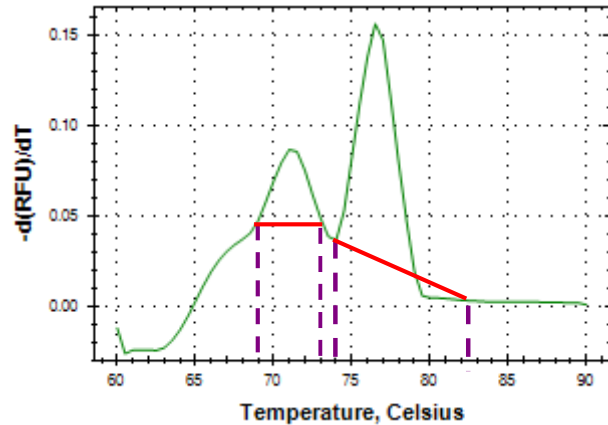
※温度値は、MiniOpticon™(Bio-Rad 社)での測定値です。
機種によっては値が前後する場合があります。
この場合は、内部標準の Tm 値を算出し、71°Cとの温度差分、平行移動した値を温度域としてください。
(一部の機種では、平行移動ではない場合もあります。)

●融解曲線解析の例

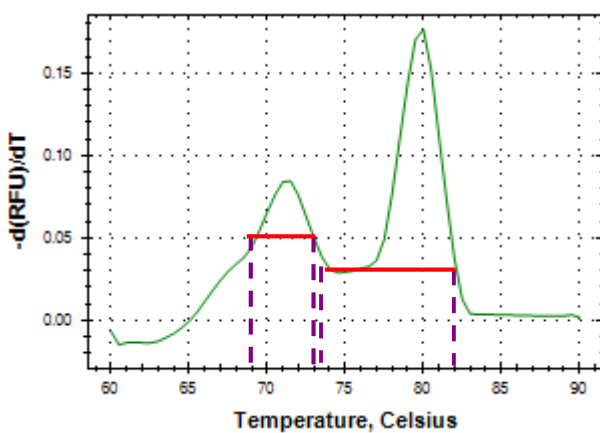
陰性



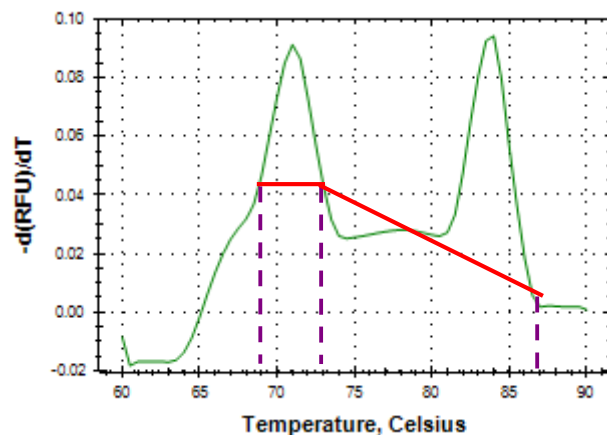
サルモネラ陽性



腸管出血性大腸菌陽性



赤痢菌陽性



[7] 性能

各種の生菌数を含む陽性糞便からの検出

下表に記載の濃度の対象菌を含む陽性糞便を作製し、培養法および本製品でそれぞれ検出しました。その結果、本製品は培養法に対し、サルモネラおよび腸管出血性大腸菌 O157 で 100 倍、赤痢菌で 1000 倍の検出感度を示しました。この結果より、50 個の検体をプールしても培養法以上の感度を保持していることが確認できました。

サルモネラ	生菌数(cfu/g)	0	5×10^1	5×10^2	5×10^3	5×10^4	5×10^5
	培養法	-	-	-	-	+	+
	本製品 PCR 法	-	-	+	+	+	+
O157	生菌数(cfu/g)	0	3×10^1	3×10^2	3×10^3	3×10^4	3×10^5
	培養法	-	-	-	-	+	+
	本製品 PCR 法	-	-	+	+	+	+
赤痢菌	生菌数(cfu/g)	0	3×10^1	3×10^2	3×10^3	3×10^4	3×10^5
	培養法	-	-	-	-	+	+
	本製品 PCR 法	-	+	+	+	+	+

[8] 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	加熱処理済糞便懸濁液を更に 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 反応液を長時間放置した	PCR 反応液を調製後は放置せず、直ちに検体の添加、PCR、融解曲線解析を実施してください。
	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てください。目安として、 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{step}$ 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、非特異増幅が発生し、陽性と判定される場合があります。加熱処理済糞便懸濁液を更に 10 倍程度滅菌水等で希釈してご使用ください。
予想以上に陽性率が高い	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。

[9] 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
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	100 反応	FIK-203

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】

ー納期・注文に関するお問い合わせー

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

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

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>